

*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III*  
*PROF. DR. WOLFGANG HERR*  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss des PPAR $\gamma$  Agonisten Pioglitazon auf  
murine Knochenmarksmakrophagen im Kontext des  
Mammakarzinoms**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Vorgelegt von  
Florian Lücke

2018



*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III*  
*PROF. DR. WOLFGANG HERR*  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss des PPAR $\gamma$  Agonisten Pioglitazon auf  
murine Knochenmarksmakrophagen im Kontext des  
Mammakarzinoms**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Vorgelegt von  
Florian Lücke

2018

|                             |                                   |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Dekan:                      | Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert |
| 1. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Tobias Pukrop           |
| 2. Berichterstatter:        | PD Dr. Anja-Kathrin Wege          |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 29. November 2018                 |

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis.....   | 3  |
| 1 Einleitung .....   | 4  |
| 1.1 Triple negativer (TN) Brustkrebs .....   | 4  |
| 1.2 Biomodulation und metronome Chemotherapie .....                                    | 5  |
| 1.3 Tumor-assoziierte Makrophagen und PPAR $\gamma$ .....                              | 8  |
| 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....  | 10 |
| 2 Material und Methoden .....  | 11 |
| 2.1 Geräte und Laborausrüstung .....   | 11 |
| 2.2 Reagenzien .....   | 11 |
| 2.3 Assay-Kits .....   | 12 |
| 2.4 Puffer .....   | 13 |
| 2.5 Primer .....   | 14 |
| 2.6 Antikörper .....   | 14 |
| 2.7 Isolation muriner Knochenmarksmakrophagen (MDMs) .....                             | 15 |
| 2.7.1 Herstellung von konditioniertem L929 Medium .....                                | 16 |
| 2.8 Zellkultur .....   | 16 |
| 2.8.1 Kultur von „monocyte derived macrophages“ .....                                  | 16 |
| 2.8.2 Kultur und Pioglitazonstimulation von 410.4 und 4T1 .....                        | 17 |
| 2.9 Mikroskopie von Knochenmarksmakrophagen (MDMs) .....                               | 18 |
| 2.9.1 Durchlichtmikroskopie .....  | 18 |
| 2.9.2 Immunfluoreszenzfärbung .....  | 19 |
| 2.10 Toxizitätsassays .....  | 20 |
| 2.10.1 MTT-Assay .....   | 20 |
| 2.10.2 BrdU-Assay .....  | 20 |
| 2.11 Proteinbiochemie .....  | 21 |
| 2.11.1 Proteinisolation aus MDMs für Western Blot Analysen .....                       | 21 |
| 2.11.2 Proteinbestimmung nach Lowry .....  | 21 |
| 2.11.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....  | 22 |
| 2.11.4 Western Blot .....  | 22 |
| 2.12 Molekularbiologie .....   | 23 |
| 2.12.1 RNA-Isolation für mRNA Expressionsanalysen .....                                | 23 |
| 2.12.2 cDNA Synthese .....   | 24 |
| 2.12.3 qRT-PCR .....   | 25 |
| 3 Ergebnisse .....   | 26 |
| 3.1 Toxizitätsuntersuchungen .....   | 26 |
| 3.1.1 Pioglitazon wirkt nicht toxisch auf MDMs im MTT .....                            | 26 |
| 3.1.2 Pioglitazon zeigt eine dosisabhängige Toxizität auf MDMs im BrdU-<br>Assay ..... | 26 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.1.3 | Pioglitazontoxizität auf die murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4. und 4T1 im MTT-Assay.....                            | 27 |
| 3.1.4 | Pioglitazontoxizität auf die murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 und 4T1 im BrdU-Assay.....                            | 28 |
| 3.2   | Morphologie Pioglitazon-stimulierter MDMs.....   | 29 |
| 3.2.1 | Pioglitazon beeinflusst die Morphologie von MDMs nicht .....   | 30 |
| 3.2.2 | Pioglitazon beeinflusst das Zytoskelett von MDMs nicht.....  | 31 |
| 3.2.3 | Pioglitazon beeinflusst die zelluläre Verteilung von E-Cadherin in MDMs nicht.....                                       | 33 |
| 3.3   | Western Blot Analysen von Pioglitazon stimulierten MDMs, 4T1-Zellen und 410.4-Zellen .....                               | 36 |
| 3.3.1 | Pioglitazon erhöht dosisabhängig die Expression von E-Cadherin in MDMs .....   | 36 |
| 3.3.2 | Pioglitazon hat keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in den murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 und 4T1 ..... | 36 |
| 3.3.3 | Pioglitazon führt nicht zu einer Aktivierung von $\beta$ -Catenin in MDMs ....   | 38 |
| 3.3.4 | Pioglitazon hat keinen aktivierenden Effekt auf Akt und GSK3 $\beta$ .....   | 39 |
| 3.4   | mRNA-Expressionsanalysen mit Pioglitazon stimulierten MDMs .....   | 41 |
| 3.4.1 | Tnf $\alpha$ und Il1- $\beta$ werden in MDMs durch Pioglitazon nicht aktiviert .....                                     | 41 |
| 3.4.2 | Pioglitazon beeinflusst den Wnt-Signalweg in MDMs nicht.....   | 42 |
| 3.4.3 | Pioglitazon stabilisiert E-Cadherin nach 24h in MDMs.....  | 43 |
| 4     | Diskussion .....   | 45 |
| 4.1   | Klinische und präklinische Erfahrungen mit Makrophagenrepolarisation und PPAR $\gamma$ -Stimulation .....                | 45 |
| 4.2   | PPAR $\gamma$ ist mit dem Wnt-Signalweg verknüpft .....  | 46 |
| 4.3   | Das „Wnt-target“ E-Cadherin spielt eine Rolle in Differenzierung myeloischer Zellen .....                                | 46 |
| 4.4   | Pioglitazon wirkt ab 5 $\mu$ M toxisch auf MDMs.....   | 48 |
| 4.5   | Pioglitazon hat keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Zelllinien 4T1 und 410.4.....                                   | 48 |
| 4.6   | Pioglitazon führt nicht zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges in MDMs .....   | 49 |
| 4.7   | Pioglitazon hat keinen Effekt auf den PI3K Signalweg in MDMs .....   | 49 |
| 4.8   | Pioglitazon stimuliert die Expression von E-Cadherin in MDMs.....  | 49 |
| 5     | Zusammenfassung .....  | 52 |
| 6     | Literaturverzeichnis.....  | 53 |
|       | Danksagung .....   | 61 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| Akt             | RAC- $\alpha$ Serin/Threonin-Protein Kinase                 |
| Axin2           | Axis inhibition protein 2                                   |
| Balb/c          | Mausinzuchstamm   |
| BrdU            | Bromdesoxyuridin  |
| BSA             | Bovines Serumalbumin  |
| CD86            | Cluster of differentiation 86                               |
| cDNA            | „Complementary“ Desoxyribonukleinsäure                      |
| CML             | chronisch myeloische Leukämie                               |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid   |
| COX 2           | Cyclooxygenase 2  |
| DKK2            | Dickkopf 2  |
| DMEM            | Dubelco's modified Eagle Medium                             |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid  |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                                      |
| ECL             | Enhanced Chemiluminescence                                  |
| FITC            | Fluorescein isothiocyanate                                  |
| GAPDH           | Glycerinaldehyddehydrogenase                                |
| GSK3- $\beta$   | Glykogensynthasekinase3 $\beta$                             |
| HDACi           | Histondeacetylaseinhibitor                                  |
| HRP             | Meerrettichperoxidase                                       |
| HSP 90          | Heat Shock Protein 90kDa                                    |
| IgG             | Immunglobulin Klasse G                                      |
| IL              | Interleukin   |
| LPS             | Lipopolysaccharid   |
| MDM             | Monocyte Derived Macrophage (Knochenmarksmakrophage)        |
| MTT             | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid  |
| NF $\kappa$ B   | Nukleärer Faktor $\kappa$ B                                 |
| PBS             | Phosphat gepufferte Saline                                  |
| PFA             | Paraformaldehyd   |
| Pgk1            | Phosphoglycerinkinase 1                                     |
| p-GSK3- $\beta$ | Phosphorylierte Glykogensynthasekinase 3 $\beta$            |
| PI3K            | Phosphoinositidylkinase 3                                   |
| PPAR            | Peroxisome proliferator activated receptor                  |
| qRT-PCR         | Quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion |
| RIPA            | Radioimmunoprecipitation assay                              |
| RNA             | Ribonukleinsäure  |
| Rpm             | Revolutions per minute                                      |
| SDS             | Natriumdodecylsulfat  |
| STAT            | Signal transducer and activator of transcription            |
| TAM             | Tumor assoziierter Makrophage                               |
| TBST            | Tris buffered Saline + 10% Tween                            |
| TGF $\beta$     | Transforming growth factor $\beta$                          |
| TLR             | Toll-like Rezeptor  |
| TN              | Triple negativ  |
| TNF $\alpha$    | Tumornekrosefaktor $\alpha$                                 |
| TRITC           | Tetramethylrhodamine  |
| Wnt             | wingless-type MMTV integration site family                  |

# 1 Einleitung

## 1.1 Triple negativer (TN) Brustkrebs

Brustkrebs ist weltweit die häufigste Tumorerkrankung der Frau. In Deutschland lag die Inzidenz der Neuerkrankungen 2014 bei 69.220. Dies entspricht 30% aller Krebserkrankungen (1). Der Begriff Brustkrebs umfasst mittlerweile eine sehr heterogene Gruppe an Tumorerkrankungen. Molekulare Untersuchungen haben ergeben, dass man die Erkrankung mindestens in Hormonrezeptoren oder Her2Neu exprimierende und in die Triple negativen (TN) Tumore unterteilen kann. Die Behandlung des Brustkrebses umfasst heute eine multimodale Kombinationstherapie bestehend aus Operation, Strahlentherapie und systemischer Therapie in Abhängigkeit von Ausbreitungsstadium und molekularem Markerprofil. Während die Prognose und das Gesamtüberleben für Patientinnen mit Hormonrezeptor und Her2Neu exprimierenden Tumoren durch die Einführung von antihormonellen Therapien und therapeutischen Antikörpern stark verbessert werden konnte, sind TN-Tumore nach wie vor besonders schwierig zu therapieren. Immerhin fallen ca. 25% der Patientinnen mit Brustkrebs in die letzte Kategorie. Für deren Behandlung kommt aktuell nur eine Chemotherapie als Behandlungsmethode nach Operation und Strahlentherapie in Frage, was das schlechte Langzeitüberleben dieser Subgruppe unterstreicht. Während für Patientinnen der anderen Subgruppen Überlebensraten deutlich gestiegen sind, hat sich bei den TN-Erkrankungen essentiell seit 15 Jahren kein Durchbruch ergeben. Trotz vieler Versuche die Erkrankung besser zu verstehen und weiter zu kategorisieren, gibt es für diese Patientengruppe immer noch keinen zielgerichteten therapeutischen Ansatz (2). Während Patientinnen mit Stadium I TN-Brustkrebs in der Regel vor allem durch chirurgische Ansätze gut kurativ behandelt werden können (Abbildung 1.1 schwarze Kurve), steigt ab Stadium II die Mortalität deutlich an (Abbildung 1.1 braune Kurve). Insbesondere Patientinnen mit metastasierter Erkrankung zeigen ein sehr schlechtes Gesamtüberleben (Abbildung 1.1, grüne Kurve). Selbst nach radikaler chirurgischer Resektion beträgt die mediane Zeitspanne bis zum Fortschreiten der Erkrankung ca. 18 Monate und das mediane Gesamtüberleben nur ca. 24 Monate (3, 4).

Diese Situation verlangt nach veränderten Behandlungskonzepten, die neue Ansätze zur Behandlung dieser Erkrankung bieten.



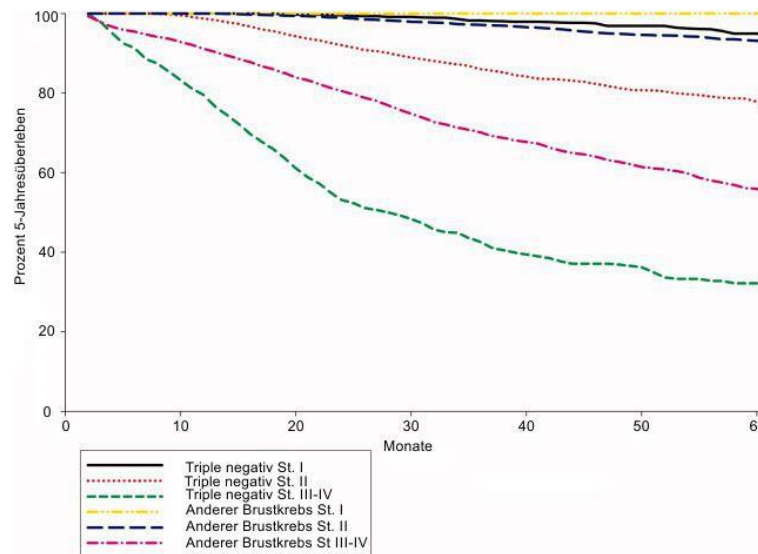


Abbildung 1.1: Relative Überlebenszeit triple-negativer Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu anderen Brustkrebspatientinnen anhand des Stadiums bei Diagnose, Kalifornien 1999-2003, Abbildung modifiziert aus (3). Dem Autor liegt eine schriftliche Genehmigung zur Verwendung des Materials vor.

## 1.2 Biomodulation und metronome Chemotherapie

Eine mögliche Strategie zur Verbesserung der Therapie der TN-Tumore ist die metronome Chemotherapie, die anstelle gepulster, hoch dosierter Zytostatikagaben die minimale, biologisch aktive Dosis der Medikamente als kontinuierliche Gabe verwendet (5). Diese meist oralen Schemata haben neben dem zytostatischen Effekt noch einige andere vorteilhafte Wirkungen. Es ist z.B. bekannt, dass eine metronome Therapie mit Capecitabine die Tumorendothelzellen ebenfalls beeinflusst und somit einen antiangiogenetischen Effekt auf den Tumor ausübt (6, 7). Weiter kommt es, abhängig von der verwendeten Substanz, zu einer Art Immunmodulation. Zum Beispiel reduziert Cyclophosphamid die Anzahl regulatorischer T-Zellen und vermindert dadurch deren immunsuppressiven Effekt (8). Außerdem können sehr niedrige Dosen klassischer Zytostatika wie z.B. Doxorubicin, Methotrexat und Paclitaxel einen immunmodulatorischen Effekt auf dendritische Zellen ausüben, was deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen erhöht (9).

Obwohl in Studien zunehmend metronome Chemotherapieschemata mit neuen Substanzen wie Proteinkinaseinhibitoren als sogenannte „targeted therapies“ und Immuncheckpointinhibitoren kombiniert werden (10), bleibt das Gros der metronomen Therapien auf eine rein zytostatische Therapie beschränkt und die oben erwähnten

Mechanismen sind eher ein willkommener Nebeneffekt der Therapie als eine vorab bewusst einkalkulierte Wirkung. In solchen erweiterten metronomen Therapiekonzepten liegt ein enormes therapeutisches Potential. Die Hinzunahme weiterer, nicht zytostatisch wirksamer Substanzen zur metronomen Chemotherapie führt über vermehrte Modulation des Tumornetzwerkes, bestehend aus Tumorzellen, Stromazellen und extrazellulärer Matrix (=Biomodulation) zu einer weiteren Effektivitätssteigerung der Therapie, insbesondere bei metastasierten Erkrankungen. Klinische Erfahrungen mit solchen Konzepten gibt es bereits beim Prostatakarzinom, dem klarzelligen Nierenzellkarzinom und der Langerhanszellhistiozytose (11).

Diese Biomodulation zielt auf einen weiteren Progressionsfaktor beinahe jeder Tumorerkrankung ab: chronische Inflammation. Diese begünstigt das Tumorwachstum, fördert Angiogenese und, im Gegensatz zur akuten Entzündung, reduziert sie die tumorizide Wirkung des Immuninfiltrates und darüber die immunologische Tumorkontrolle (12). Die Modulation dieser Inflammation stellt daher einen weiteren Ansatz dar den Tumor zu behandeln (13). Makrophagen sind ein integraler Bestandteil dieses Entzündungsinfiltrates. Dies macht sie zu Zielen für neue therapeutische Strategien. Ein Regulator dieser chronischen Entzündung bei Makrophagen, ist die Gruppe der „Peroxisome proliferator-activated Rezeptoren“ (PPAR). Damit bieten sich diese PPARs als ein potentiell Ziel für eine biomodulatorische Therapie an (14).

PPARs sind eine Gruppe nukleärer Transkriptionsfaktoren und werden von beinahe allen Zelltypen exprimiert. Es gibt drei Isoformen, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$ . Jede der Isoformen zeigt nach Aktivierung ihr eigenes spezifisches Signalmuster. Nach Ligandenbindung beeinflussen sie die Expression eines großen Netzwerkes an Genen und anderen Signalwegen durch Transaktivierung oder Transrepression. Im Folgenden soll vor allem die Funktion der Isoform PPAR $\gamma$  weiter beleuchtet werden. PPAR $\gamma$  eignet sich gut für eine biomodulatorische Therapie aufgrund der Expression in vielen Zelltypen im Tumorstroma (15).

Für die Transaktivierung bildet PPAR $\gamma$  nach Bindung eines Liganden ein Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor. Dieser Komplex bindet anschließend an „DNA-PPAR-response“ Elemente, welche die Transkription einer Vielzahl an Zielgenen beeinflussen (16). Bei der Transrepression inhibiert der Ligand-PPAR-Komplex verschiedene Signaltransduktionskaskaden und unterdrückt so die Genexpression der

damit verknüpften Gene (15). So reguliert PPAR $\gamma$  grundlegende Zellfunktionen zur Glukoseverwertung, Proliferation und Entzündung.

Die Isoform PPAR $\gamma$  kommt zusätzlich in drei weiteren Unterformen vor. PPAR $\gamma$ 1 wird vornehmlich in Fettgewebe, Skelettmuskel, Lebergewebe und Herzmuskel exprimiert. PPAR $\gamma$ 2 wird hauptsächlich in Fettgewebe exprimiert (17). PPAR $\gamma$ 3 kommt vor allem in Makrophagen vor (18), deren Phänotyp in dieser Arbeit nach Stimulation von PPAR $\gamma$  betrachtet wurde.

Die Gene, die durch PPARs reguliert werden betreffen vorwiegend den Lipid- und Glukosestoffwechsel (19). PPAR $\gamma$  greift aber auch in den Eicosanoid-Signalweg ein. Es unterdrückt z.B. die Induktion von Cox-2 und kann proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  über die Repression von NF $\kappa$ B abschalten (13, 19). Damit nimmt es Einfluss auf zwei Masterregulatoren von Entzündungsreizen. Ein weiterer Signalweg, der durch PPAR $\gamma$  mit reguliert wird ist der Wnt-Signalweg. Die Wnt-Signalkaskade ist bei verschiedenen Tumoren dereguliert und hat wichtige Funktionen in der Embryogenese (20, 21). Eine Komponente des Wnt-Signalweges ( $\beta$ -Catenin), interagiert mit PPAR $\gamma$  über eine Catenin-Bindungsdomäne und führt so zum Abbau von phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin über das Proteasom (22). Dies vermindert die Aktivität des Wnt-Signalweges, der sowohl im Tumor, als auch im umgebenden Immuninfiltrat eine Rolle spielt (23, 24). Das Wnt-Signalnetzwerk ist außerdem mit PI3K Signalweg über das Protein Akt verbunden (14). Somit greift PPAR $\gamma$  indirekt und direkt in Signalkaskaden ein, die mit Entzündung, Proliferation und Zelldifferenzierung verbunden sind.

Mit den Thiazolidindionen existiert eine bereits zugelassene Medikamentengruppe mit langjähriger klinischer Erfahrung, was PPAR $\gamma$  zu einem naheliegenden „drugable target“ macht. Thiazolidindione gehören zu einer Stoffgruppe, die als Agonisten von PPAR $\gamma$  wirken. Ein Vertreter der Thiazolidindione ist Pioglitazon. Es ist primär als orales Antidiabetikum zur Senkung der Inulinresistenz zugelassen. Neben dieser Hauptwirkung auf die Verbesserung der Glukoseresistenz bei Diabetikern gibt es multiple, pleiotrope Wirkungen des Medikaments. Es sind Wirkungen auf den Blutdruck (25), die renale Albuminexkretion (26), die Plättchenfunktion (27) und Inflammation (28) beschrieben.

### 1.3 Tumor-assoziierte Makrophagen und PPAR $\gamma$

Wesentliche Effektorzellen der chronischen Inflammation im Tumorgewebe sind Makrophagen. Da diese PPAR $\gamma$ 3 exprimieren, ist dieser Zelltyp ein zentrales „Target“ für Biomodulation im Tumor. Besonders im Hinblick auf die Immunonkologie rückt das Interesse an der Beeinflussung der Makrophagen zunehmend in den Fokus vieler Untersuchungen und stellt ein interessantes Untersuchungsobjekt dar. Im Gegensatz zu anderen Zelltypen besitzen Makrophagen eine enorme morphologische und phänotypische Plastizität und sind darüber gut medikamentös beeinflussbar.

Makrophagen, die in einen Tumor einwandern, verändern nach Kontakt mit der Tumormikroumgebung ihren Phänotyp in einer charakteristischen Art und Weise. Insbesondere eine erhöhte Anzahl dieser Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) korreliert mit einem schlechten Überleben, indem sie die Metastasierung von Tumorzellen erleichtern (29-31). In der Literatur werden hierfür zwei Mechanismen diskutiert. Zum einen setzen Makrophagen verschiedene Proteasen in ihrer Umgebung frei. Diese lokale Proteolyse der Basalmembran im Tumor erleichtert so die Durchwanderung von Tumorzellen durch die Basalmembran. Die Tumorzellen erhalten damit leichter Anschluss an Lymph- und Blutgefäße und können somit in andere Gewebe metastasieren (32). Der zweite Mechanismus begünstigt Metastasierung durch eine Verbesserung der Invasionskapazität der Karzinomzellen. Zum Beispiel führt Sekretion von Wnt5a von Makrophagen zu einer vermehrten Tumorzellinvasion von Mammakarzinomzellen über einen alternativen Wnt-Signalweg (24).

TAMs wird daher aus verschiedenen Gründen bei der Kontrolle von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Sie können sowohl tumorizid, als auch protumorigen wirken und darüber hinaus sogar die Metastasierung unterstützen (33, 34). Entscheidend ist dabei der jeweilige Immunphänotyp des Makrophagen. Vereinfachend werden die Aktivierungszustände in drei übergeordnete Gruppen eingeteilt. Der erste Typus ist der klassisch aktivierte Makrophage, der über Toll-like Rezeptoren oder Interferon $\gamma$  aktiviert wird und sich durch seine hohe Entzündungsaktivität und die signifikante Produktion reaktiver Sauerstoffspezies auszeichnet. Der zweite Phänotyp ist der an der Wundheilung beteiligte, chronisch aktivierte Makrophage. Dieser wird typischerweise durch Interleukin 4 aktiviert, wirkt entzündungshemmend und ist am Aufbau der extrazellulären Matrix für regenerative

Prozesse und Narbenbildung beteiligt. Der dritte Phänotyp ist der regulatorische Makrophage. Dieser wird z.B. durch Glukokortikoide induziert. Diese Makrophagen können durch Sekretion von Interleukin 10 Entzündungsreaktionen effektiv unterdrücken, stellen aber z.B. keine Bestandteile extrazellulärer Matrix her. Diese drei Phänotypen stellen die Extreme der Makrophagenausprägung dar. Es existiert aber ein beinahe stufenloses Kontinuum an Zwischenausprägungen, die eine klare Einordnung des einzelnen Makrophagen oft schwierig machen. Zudem besitzen Makrophagen eine hohe Plastizität, die es ihnen ermöglicht innerhalb kürzester Zeit ihren Phänotyp drastisch zu ändern und in eine andere Gruppe zu wechseln.

Eine Modulation der TAM über den PPAR $\gamma$  Signalweg könnte daher eine Möglichkeit darstellen Patientinnen mit TN-Mammakarzinom eine neuartige biomodulatorische Therapie zur Verfügung zu stellen und damit deren Überleben zu verbessern. Die in dieser Arbeit untersuchte biologische Aktivität des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon bei verschiedenen Krebserkrankungen ist bereits in einigen kleinen Studien untersucht worden. Bei metastasiertem Nierenzellkarzinom zeigte sich z.B. ein Ansprechen von 76% der Patienten auf eine Kombinationstherapie aus Pioglitazon, Etoricoxib, Interferon  $\alpha$  und Capecitabine (35). Auch beim fortgeschrittenen malignen Melanom konnte durch die Hinzunahme von Pioglitazon und Rofecoxib zu einer Trofosamidtherapie eine Verbesserung des Überlebens erreicht werden (36). Dies belegt die biologische Aktivität von Pioglitazon eingebettet in metronome Therapieschemata über präklinische Daten hinaus. Auf der anderen Seite musste eine Studie bei Glioblastomen aufgrund von unzureichendem Ansprechen dieses sehr aggressiven Tumors auf eine Kombinationstherapie aus Rofecoxib, Pioglitazon und Capecitabine oder Temozolomid vorzeitig beendet werden (37). Dies bedeute auch, dass die Wirkung kontextabhängig ist und bisher eine systematische Analyse der einzelnen zellulären Komponenten in der Tumormikroumgebung noch aussteht.

Über die Mechanismen wie sich der Polarisationsphänotyp von Makrophagen mit Pioglitazon beeinflussen lässt und welche Signalwege dabei eine Rolle spielen, ist bisher nur wenig bekannt. Deshalb sollte in dieser Arbeit der Phänotyp von murinen Knochenmarksmakrophagen nach Pioglitazonstimulation weiter untersucht werden um mögliche Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien zu evaluieren. Der Immunphänotyp von TAMs liegt in der Regel zwischen dem Wundheilungs- und dem

regulatorischen Makrophagen und ihnen wird eine eher entzündungshemmende Funktion zugeschrieben (38). Insbesondere aufgrund ihrer hohen Plastizität und der dadurch bedingten Beeinflussbarkeit bieten sich Makrophagen als therapeutisches Ziel für neue Therapieansätze an.

#### 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es deshalb als ersten Schritt auf dem Weg zu einer biomodulatorischen Therapie den Effekt von Pioglitazon auf den Phänotyp von „monocyte derived macrophages“ als *in vitro* Modell für TAMs zu untersuchen. Mittels Western Blot und qRT-PCR wurden die Effekte auf Teile des Wnt Signalnetzwerkes, den PI3K-Signalweg und TNF $\alpha$  als Surrogatparameter für akute Entzündung untersucht und gegen den mit LPS „klassisch“ aktivierten Makrophagen abgegrenzt. Ebenso wurden toxische und modulatorische Effekte auf die murinen Modellzelllinien 410.4 und 4T1 für TN-Brustkrebs untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Laborausrüstung

Tabelle 2-1: Verwendete Labormaterialien

| Gerät  | Hersteller                 |
|--|----------------------------|
| Biofuge pico (Heraeus)                           | Thermo-Scientific          |
| Incubator for cell culture (Heraeus)             | Thermo-Scientific          |
| Inverse microscope (Wilovert)                    | Helmut Hund GmbH           |
| Laminar Flow (Heraeus)                           | Thermo-Scientific,         |
| Megafuge 1.0 (Heraeus)                           | Kendro Laboratory Products |
| NanoDrop ND-1000 spectrophotometer               | Peqlab                     |
| Neubauer Improved cell counting chamber          | LO Laboroptik              |
| Pipetboy accujet pro                             | BRAND GMBH + Co KG         |
| Pipettes (100-1000µl, 20-200µl, 2-20µl, 0.2-2µl) | Gilson                     |
| Real-time PCR machine ABI prism                  | Applied Biosystems         |
| TECAN Sunrise Infinite F50 ELISA Reader          | Tecan Group                |
| Thermal Cycler DNA Engine                        | Bio-Rad                    |
| Thermomixer 5436                                 | Eppendorf                  |
| Trans-Blot SD semi-dry transfer cell             | Bio-Rad                    |
| Vortex shaker REAX 2000                          | Heidolph Instruments       |
| Water bath SW-20C                                | Julabo GmbH                |

### 2.2 Reagenzien

Tabelle 2-2: Verwendete Reagenzien mit Hersteller

| Reagenz                 | Hersteller |
|-------------------------|------------|
| Ammoniumperoxodisulfate | Merck      |
| Aceton                  | Merck      |
| Ameisensäure >98% p.a.  | Roth       |
| Albumin Fraktion V      | Roth       |
| Crystal violet solution | Sigma      |
| DAPI                    | Sigma      |
| DMSO                    | Sigma      |

| Reagenz                                       | Hersteller                               |
|---|--|
| Dulbeccos Phosphate Buffered Saline           | Gibco                                    |
| Essigsäure 100%                               |  |
| Ethanol                                       | Sigma                                    |
| Fluorescent Mounting Medium                   | Dako                                     |
| Formaldehyd <5%                               |  |
| Glycerol                                      | Sigma                                    |
| Lipopolysaccharid aus E. Coli O26:B6 (1mg/ml) | Sigma                                    |
| 2- Mercapto-ethanol                           | Sigma                                    |
| Methanol                                      | Merck                                    |
| Milchpulver                                   | Roth                                     |
| Natriumacetat >99% p.a.                       | Roth                                     |
| Normal goat serum                             | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. |
| 2-Paropanol                                   | VWR                                      |
| Paraformaldehyde                              | Merck                                    |
| Phalloidin-Fluoresceinisothiocyanat-Konjugat  | Sigma                                    |
| Pioglitazon                                   | Sigma                                    |
| PMSF  | Thermo Scientific                        |
| Protease Inhibitor Cocktail                   | Sigma                                    |
| SDS Pellets >99%                              | Roth                                     |
| Sodium acetate >99%                           | Sigma                                    |
| Sodium Deoxycholate >97%                      | Sigma                                    |
| Triton X-100                                  | Sigma                                    |
| Trizma R Base                                 | Sigma                                    |
| Tween 20                                      | Sigma                                    |

## 2.3 Assay-Kits

Tabelle 2-3: Kommerzielle Kits

| Name                              | Hersteller |
|-----------------------------------|------------|
| iScript cDNA synthesis Kit        | Bio-Rad    |
| High Pure RNA isolation Kit       | Roche      |
| BrdU Cell Proliferation ELISA Kit | Abcam      |
| DC Protein Assay                  | Bio-Rad    |



## 2.4 Puffer

Tabelle 2-4: Namen und Zusammensetzung der verwendeten Puffer

| Name                          | Bestandteile   |
|-------------------------------|--|
| MTT Lysepuffer                | %5 (v/v) Ameisensäure in Isopropanol   |
| MTT Reagenz (Stammlösung 10x) | 5 g/l Thiazolyl Blau Tetrazolium Bromid in PBS   |
| Kulturmedium MDMs             | DMEM<br>10% FCS<br>5% L929   |
| Pluznikmedium                 | DMEM mit L-Glutamin<br>10% v/v FCS<br>5% Normales Pferdeserum<br>30% L929 konditioniertes Medium<br>1% Natriumpyruvat (11mg/l Stammlösung)<br>1ml $\beta$ -Mercaptoethanol (1000x vorverdünnt) |
| Trenngelpuffer                | 1,15M TrisHCl pH 8,8   |
| Sammelgelpuffer               | 0,38 M TrisHCl pH 6,8  |
| RIPA                          | 50mM TrisHCl pH 7,2<br>150mM NaCl<br>0,1% (w/v) SDS<br>0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat<br>1% Triton X-100   |
| Blotpuffer (10x)              | 0,25M Tris-Base<br>2M Glycin   |
| Blotpuffer (1x)               | 1 Teil Blotpuffer (10x)<br>7 Teile deionisiertes Wasser<br>2 Teile Methanol  |
| Elektrophoresepuffer (10x)    | 250mM Tris Base<br>2M Glycin<br>1% (w/v) SDS   |
| Ponceaurot                    | 0,5% (w/v) Ponceau<br>1% (v/v) Essigsäure  |

## 2.5 Primer

Tabelle 2-5: Name und Sequenzen der verwendeten qRT-PCR Primer

| Primername   | Abkürzung    | Genname   | Forward-Primer<br>5'-3'    | Reverse Primer<br>5'-3'  |
|--------------|--------------|---|----------------------------|--------------------------|
| mm-Wnt5a     | Wnt-5a       | wingless-related<br>MMTV<br>integration site<br>5A                | TTACACAACAATGA<br>AGCAGG   | ACACTCCATGACA<br>CTTACAG |
| mm_Tnf-alpha | Tnf $\alpha$ | tumor necrosis<br>factor  | TCCCCAAAGGGAT<br>GAGAAAGT  | CTCCTCCACTTGG<br>TGGTTTG |
| mm-Axin2     | Axin2        | axin2   | ACGATTCCATGTC<br>CAGAC     | AATGAGGTAGAGA<br>CACTTGG |
| mm-Il1b      | Il1b         | Il1b interleukin 1<br>beta  | GTAATGAAAGACG<br>GCACACC   | ACTCTGCAGACTC<br>AAACTCC |
| mm-Spi1      | Spi1         | Proto-Oncogene<br>/ Hematopoietic<br>Transcription<br>Factor PU.1 | CTTACGATTCAGA<br>GCTATACCA | TCAGGGAAGTTCT<br>CAAATC  |
| mm-Ecad      | Cdh1         | Cadherin 1  | GGATATTAATGACA<br>ACGCTCC  | GCATTGACCTCATT<br>CTCAG  |
| mm-Gapdh     | GAPDH        | glyceraldehyde-<br>3-phosphate<br>dehydrogenase                   | CATCTTGGGCTAC<br>ACTGAG    | CTGTAGCCGTATT<br>CATTGTC |
| mm-Pgk1      | PgK1         | phosphoglycerat<br>e kinase 1                                     | TGTCCAAACTAGG<br>AGATGTC   | CCTTGGCAAAGTA<br>GTTCAG  |
| mm-Dkk2      | Dkk2         | Dickkopf 2  | CATCCTCACCCCA<br>CATATCC   | GTAGGCATGGGTC<br>TCCTTCA |
| mm-CD86      | CD86         | B7-2  | GTCCAAGAAGCCG<br>AATCAG    | CTCTGTCAGCGTT<br>ACTATCC |

## 2.6 Antikörper

Tabelle 2-6: Name, Spezies und Hersteller der verwendeten Antikörper für Western-Blot Analysen und Immunfluoreszenzmikroskopie

| Name                                | Spezies, Typ            | Firma           | Katalog Nr. |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------|
| $\beta$ -Actin                      | Maus,<br>monoklonal IgG | Sigma-Aldrich   | A5441       |
| GSK-3 $\beta$                       | Hase,<br>monoklonal IgG | Cell Signalling | 9315        |
| p-GSK-3 $\alpha/\beta$<br>(Ser21/9) | Hase, polyklonal        | Cell Signaling  | 9331        |

| Name                                | Spezies, Typ                     | Firma          | Katalog Nr. |
|-------------------------------------|----------------------------------|----------------|-------------|
| Akt                                 | Hase, polyklonal                 | Cell Signaling | 9272        |
| p-Akt (Ser473)                      | Hase, monoklonal IgG             | Cell Signaling | 4060        |
| E-Caderin                           | Hase, monoklonal IgG             | Cell Signaling | 3195        |
| Active- $\beta$ -Catenin (anti-ABC) | Maus, monoklonal IgG1 $\kappa$   | Millipore      | 05-665      |
| $\beta$ -catenin                    | Maus, monoklonal IgG1            | Santa Cruz     | sc-7963     |
| HSP 90 $\alpha/\beta$               | Maus, monoklonal IgG2a           | Santa Cruz     | sc-13119    |
| Ziege-anti-Maus IgG-HRP             | Ziege, sekundärer anti-Maus IgG  | Santa Cruz     | sc-2005     |
| Ziege-anti-Hase IgG-HRP             | Ziege, sekundärer anti-Hase IgG  | Santa Cruz     | sc-2004     |
| Ziege-anti-Hase-FITC                | Ziege, sekundärer anti-Hase- IgG | Thermo Fischer | 31635       |

## 2.7 Isolation muriner Knochenmarksmakrophagen (MDMs)

Die Versuchstiere wurden unter Einhaltung der Tierschutzrichtlinien im zentralen Tierstall gehalten. Es wurde keine besondere Diät gefüttert und das Geschlecht der Mäuse war nicht ausschlaggebend für die Versuche. Acht bis zwölf Wochen alte Balb/c-Mäuse wurden mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und nach Desinfektion des Fells beide Femora präpariert. Diese wurden erneut in 70% Ethanol desinfiziert und anschließend in Pluznikmedium (siehe 2.4) aufgenommen. Unter der Sterilbank wurden die Epiphysen am Übergang zur Diaphyse abgetrennt und das Mark jedes Knochen von beiden Seiten mit je 2,5ml Pluznikmedium ausgespült und in einer 10cm Schale (unbeschichtet) aufgefangen. Anschließend wurde bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> für 20 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Platte vorsichtig mit 2x 10ml Pluznikmedium gewaschen. Der Überstand enthält vor allem myeloische Vorläuferzellen, die sich zur Differenzierung in Makrophagen eignen. Die Zellen wurden mittels einer Tischzentrifuge bei 1200rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 40ml

Pluznikmedium resuspendiert und je 10ml in 10cm Zellkulturschalen (beschichtet) ausgesät. Dort werden die Zellen während der Differenzierung adhärent. Die Differenzierung erfolgte über sieben Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit einmaligem Wechsel des Kulturmediums an Tag 3. Verantwortlich für die Differenzierung ist der im Pluznikmedium enthaltene Anteil an L929. Dieses konditionierte Medium enthält entsprechende Wachstumsfaktoren wie Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor, die zu einer Ausreifung in Monozyten und Makrophagen führen.

#### 2.7.1 Herstellung von konditioniertem L929 Medium

In einer 125cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden 1\*10<sup>7</sup> L929-Zellen in DMEM + 10%FCS ausgesät. Nach Inkubation für sieben Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> wurde das Medium abgenommen und über einen 0,22µm Filter sterilfiltriert. Anschließend wurde das Medium bis zur Verwendung bei -20°C in 40ml Aliquots eingefroren.

### 2.8 Zellkultur

#### 2.8.1 Kultur von „monocyte derived macrophages“

Knochenmarksmakrophagen wurden, wie unter 2.7 beschrieben, isoliert und differenziert. Anschließend wurden die Zellen in DMEM mit 1g Glukose/l und 10% FCS + 5% L929 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

##### 2.8.1.1 Pioglitazonstimulation von MDMs

Um den Effekt von Pioglitazon auf MDMs hinsichtlich Morphologie, Proteinexpression und mRNA-Expression zu untersuchen, wurden diese vorab ausgesät und stimuliert. Dazu wurde das Medium von einer 10cm Schale wurde abpipettiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit 10ml PBS pro Schale gewaschen und die Zellen nach Zugabe von 1ml Accutase für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt noch adhärente Zellen wurden durch vorsichtiges Klopfen der Kulturschale mechanisch abgelöst und die Enzymreaktion durch Zugabe von 4ml Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurde vor weiterer Verdünnung die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer, bestimmt um für die folgenden Experimente eine standardisierte Zellzahl in jedem Experiment zu erhalten.

Die Zellsuspension wurde für die folgenden Experimente, wie in Tabelle 2-7 gezeigt, verdünnt.

Tabelle 2-7: Verwendete Zellkulturschalen und Zelldichten für MDM-Experimente

| Experiment                | Verwendete Kulturschale | Zellzahl pro ml | Kulturvolumen pro Well |
|---------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------|
| MTT (2.10.1)              | 24 Well                 | $1 \cdot 10^5$  | 1ml                    |
| BrdU (2.10.2)             | 96 Well                 | $1 \cdot 10^6$  | 100µl                  |
| Proteinisolation (2.11.1) | 6 Well                  | $5 \cdot 10^5$  | 2ml                    |
| RNA-Isolation (2.12.1)    | 6 Well                  | $5 \cdot 10^5$  | 2ml                    |
| Mikroskopie               | 24 Well                 | $1 \cdot 10^6$  | 1ml                    |

Anschließend wurden die Zellen in den entsprechenden Kulturplatten ausgesät und 16 Stunden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Pioglitazon wurde in verschiedenen Konzentrationen (1mM bis 10mM) in DMSO gelöst, verdünnt und am Folgetag zupipettiert und die Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 Stunden und 72 Stunden fortgesetzt. DMSO wurde in den gleichen Mengen ohne Pioglitazon als Kontrolle mitpipettiert. Die pro well erreichte DMSO Konzentration lag zwischen 0,1% und 1%. Als weiterer Vergleichsansatz wurden Makrophagen mit 1µg/ml LPS stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Aufarbeitung für die entsprechenden Experimente wie unten aufgeführt.

## 2.8.2 Kultur und Pioglitazonstimulation von 410.4 und 4T1

In dieser Arbeit wurden die 410.4 und 4T1 Zelllinien verwendet. Beides sind Modellzellen für ein murines triple negatives Mammakarzinom. 410.4 Zellen wurden aus einem spontanen murinen Brustkrebs isoliert und in Kultur genommen. Die thioguaninresistente Zelllinie 4T1 ist aus einer Subpopulation der 410.4 über mehrere Passagen *in vitro* und *in vivo* gewonnen worden (39, 40). In vivo verhält sich die 4T1 sehr viel aggressiver als die 410.4 und metastasiert rasch hämatogen in Lunge, Leber, Knochen und Gehirn. Auch nach Entfernung des Primärtumors kommt es zu einem progredienten Krankheitsbild in der Maus. Diese Eigenschaft macht insbesondere die 4T1 zu einem guten Mausmodell für metastasierten Brustkrebs beim Menschen (41).

410.4 Zellen wurden in DMEM, supplementiert mit 10% FCS bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium ausgetauscht und bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen 1:10 gesplittet.

4T1 Zellen wurden in RPMI, supplementiert mit 10% FCS bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>, kultiviert. Auch hier musste alle zwei Tage das Medium ausgetauscht werden und die Zellen wurden ebenfalls bei Erreichen der Konfluenz 1:10 gesplittet.

Das Medium über Kulturflasche 410.4 / 4T1 wurde abgesaugt, die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und anschließend 1ml Trypsin zupipettiert. Nach Inkubation für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden restliche adhärenente Zellen durch vorsichtiges Klopfen der Kulturflasche auf einen harten Untergrund abgelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 9ml DMEM (410.4.) oder RPMI (4T1) mit 10% FCS abgestoppt und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Suspension wurde für die Aussaat weiter verdünnt (siehe Tabelle 2-8), ausgesät und anschließend für 24 Stunden bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert.

Tabelle 2-8: Kulturbedingungen für 410.4-Zellen

| <b>Experiment</b> | <b>Verwendete Kulturschale</b> | <b>Zellzahl pro ml</b> | <b>Kulturvolumen pro Well</b> |
|-------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| MTT (2.10.1)      | 24-Well                        | 2*10 <sup>4</sup>      | 1ml                           |
| BrdU (2.10.2)     | 96-Well                        | 2*10 <sup>5</sup>      | 0,1ml                         |

Am Tag der Stimulation wurde Pioglitazon in DMSO gelöst und in DMEM (410.4) / RPMI (4T1) + 10% FCS auf 0,1µM bis 2,5µM verdünnt. Das Medium über den Zellen wurde abgenommen und durch dieselbe Menge an Pioglitazon-haltigem Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte die weitere Aufarbeitung wie unter 2.10.1 und 2.10.2 beschrieben.

## 2.9 Mikroskopie von Knochenmarksmakrophagen (MDMs)

### 2.9.1 Durchlichtmikroskopie

MDMs wurden wie unter 2.8.1.1 und 2.7 dargestellt, kultiviert und mit Pioglitazon für 24 Stunden und 72 Stunden stimuliert. Schließlich wurden die Zellen direkt in der Zellkulturschale mikroskopiert um die Auswirkungen von Pioglitazon auf die Morphologie von Makrophagen zu untersuchen.

## 2.9.2 Immunfluoreszenzfärbung

In einer 24-Well Schale wurden sterilisierte Deckgläschen vorgelegt. Anschließend wurde 1ml extrazelluläre Matrix auf die Deckgläschen pipettiert und direkt wieder abgenommen. Danach wurden die Zellen wie unter 2.8.1.1 beschrieben ausgesät und für 24 Stunden und 72 Stunden mit Pioglitazon stimuliert. Am Tag der Ernte wurde das Medium abgenommen und die Zellen zwei Mal mit je einem ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml 4% PFA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurde die Fixierlösung abgenommen und durch PBS ersetzt.

### 2.9.2.1 Phalloidin- und E-Cadherinfärbung

Die Zellen wurden, wie unter 2.9.2 beschrieben, vorbereitet. Die Deckgläschen wurden erneut fünf Minuten mit 1ml PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde anschließend 10 Minuten mit PBS mit 0,5% Triton X-100 bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1:20 in PBS verdünntem „normal goat serum“ abgeblockt.

Im Anschluss wurde erneut drei Mal für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 500µl PBS + 0,5% Triton X-100 gewaschen. Daraufhin wurde eine Stunde mit 1:600 in PBS verdünntem PhalloidinTRITC bei Raumtemperatur gefärbt. Die E-Cadherinfärbung erfolgte über Nacht mit 1:200 verdünntem Hase-anti-E-Cadherinantikörper (Tabelle 2-6) bei 4°C. Danach wurde überschüssiges Reagenz / Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit 500µl PBS + 0,5% Triton-X-100 für 5 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Im Falle der E-Cadherinfärbung wurde anschließend eine Stunde mit dem FITC-gekoppelten Ziege-anti-Hase-FITC Sekundärantikörper (Tabelle 2-6) bei Raumtemperatur inkubiert und erneut drei Mal wie oben beschrieben gewaschen. Außerdem erfolgte hier eine technische Negativkontrolle, für die eine Probe ausschließlich mit Sekundärantikörper gefärbt wurde.

Für beide Ansätze wurde die Kerngegenfärbung mit 1:2000 in PBS verdünntem DAPI für 5 Minuten durchgeführt. Auch hiernach wurde, wie oben, drei Mal gewaschen. Zum Abschluss wurde ein letztes Mal mit 500µl destilliertem Wasser gewaschen, die Deckgläschen auf einen Objektträger überführt und in „Fluorescent Mounting Medium“ eingedeckelt. Bis zur Mikroskopie wurden die Präparate bei 4°C gelagert.

## 2.10 Toxizitätsassays

### 2.10.1 MTT-Assay

Die Zellen wurden wie unter 2.8.1.1 vorbereitet. Zur Detektion wurde das Medium über den Zellen abgenommen und durch MTT-haltiges (siehe 2.4) Medium ersetzt (Endkonzentration 5µg/ml) und erneut für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit setzen die Zellen das MTT zu einem bläulich kristallinen Farbstoff um, der wasserunlöslich ist und ausfällt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und pro Well 500µl MTT Lysepuffer zugegeben und für 15 Minuten unter Schütteln und Lichtschutz lysiert. Dabei wird das MTT gelöst und ändert seine Farbe ins gelbe Spektrum. Das Lysat wurde in Triplikaten á 100µl/Well in eine 96-Well Platte überführt und die Extinktion bei 540 nm vermessen. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist proportional zur Aktivität mitochondrialer Reduktasen, was als Surrogatparameter für die Zellvitalität herangezogen wird.

### 2.10.2 BrdU-Assay

Die Zellen wurden, wie unter 2.8.1.1 beschrieben, vorbereitet. Für den Assay wurde das „BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (colorimetric)“ (2.2) verwendet. Bei diesem Test wird Bromodesoxyuracil zugegeben, das in die Zellen aufgenommen wird und in die DNA integriert wird. Dieses Nukleotid kann anschließend von einem Antikörper erkannt und gefärbt werden. Die Menge an eingebautem BrdU ist proportional zur proliferativen Aktivität der Zellen. Nach Ablauf der Stimulationszeit mit Pioglitazon wurden 20µl BrdU-Lösung zugegeben und erneut für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Medium abpipettiert und 200 µl/well Fixierlösung zugegeben. Anschließend wurde entweder 30 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Fixierlösung wurde durch Umdrehen und Trockenklopfen der Platte entfernt und anschließend drei Mal mit ca. 500µl/well Waschpuffer gewaschen. Nach erneutem Trockenklopfen der Platte wurden 100µl der im Kit mitgelieferten Anti-BrdU-Antikörperlösung zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper „Peroxidase Goat Anti-Mouse-IgG Conjugate“ wurde 1:2000 verdünnt und anschließend mit einem 0,22µm Filter steriltfiltriert. Vom Filtrat wurden je 100µl/Well zupipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der oben beschriebene Waschschrift wurde erneut wiederholt. In einem letzten Schritt wurde



jedes Well einmal mit ca. 500µl destilliertem Wasser gewaschen und die Platte sorgfältig durch Klopfen getrocknet. Zum Entwickeln wurden nun 100µl/Well „TMB Peroxidase Substrate“ zugegeben und für 30 Minuten unter Lichtschutz inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl der „Stop-Solution“ beendet und die  $E_{450nm}$  ausgemessen. Die gemessenen Extinktionen wurden in Relation zu einer unbehandelten Kontrolle gesetzt, um die Zellvitalität abzuschätzen.

## 2.11 Proteinbiochemie

### 2.11.1 Proteinisolation aus MDMs für Western Blot Analysen

Zur Bestimmung der Proteinexpression verschiedener Komponenten des Wnt-Signalweges und des PI3K Signalweges wurden MDMs und Mammakarzinomzellen mit Pioglitazon stimuliert und anschließend die Proteine isoliert. Das Medium über den Zellen wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen. Pro Well wurden anschließend 50µl RIPA Puffer mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Untergrund gelöst und möglichst quantitativ in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und dieses auf Eis gestellt. Die Zelllyse wurde durch 30 Sekunden vortexen mit anschließender Inkubation auf Eis für 30 Minuten vervollständigt. Zelldebris wurden durch 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm in einer Tischzentrifuge entfernt. Die Überstände wurden in neue 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und die Proteinpräparationen bei -20°C eingefroren.

### 2.11.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Lysaten wurde das BioRad D<sub>c</sub> Protein Assay Kit verwendet. Als Proteinstandard wurde BSA in verschiedenen Konzentrationen (0µg/ml bis 1500µg/ml) in Wasser gelöst und bei jedem Test mitbestimmt. Die zu bestimmenden Proteinproben wurden 1:3 in Wasser vorverdünnt (5µl Probe in 15µl Wasser). Je 10µl Proteinstandard und verdünnte Proteinprobe wurden in 1,5ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und anschließend pro Ansatz 50µl von Reagenz A zugegeben. Diesem war zuvor Reagenz S im Verhältnis 1:49 zugesetzt worden, um SDS Rückstände aus dem Extraktionspuffer zu kompensieren. Nach kurzem Vortexen wurden 400µl Reagenz B zugegeben und jede Probe 30 Sekunden gevortext. Nach 30 Minuten Inkubation unter Lichtschutz bei Raumtemperatur wurden 100µl/ Well in Duplikaten in eine 96-Well Platte überführt und

die  $E_{700nm}$  vermessen. Anschließend wurde eine Eichgerade aus den Absorptionen des Proteinstandards erzeugt und anhand dieser die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet.

### 2.11.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

10% Polyacrylamidgele für die Proteintrennung wurden nach folgendem Protokoll gegossen (Tabelle 2-9).

Tabelle 2-9: Reaktionsansatz für 10% Polyacrylamidgel

| Trenngel 10%    |             | Sammelgel 5%    |            |
|-----------------|-------------|-----------------|------------|
| Komponente      | Menge       | Komponente      | Menge      |
| Wasser          | 3,95ml      | Wasser          | 3,45ml     |
| Acrylamidlösung | 3,35ml      | Acrylamidlösung | 0,83ml     |
| Trenngelpuffer  | 2,5ml       | Sammelgelpuffer | 0,63ml     |
| TEMED           | 10 $\mu$ l  | TEMED           | 5 $\mu$ l  |
| APS             | 100 $\mu$ l | APS             | 50 $\mu$ l |

Die Proteinproben wurden in Wasser in einem Gesamtvolumen von 15 $\mu$ l auf 1 $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt. Anschließend wurden pro Probe 5 $\mu$ l 4x Lämmli-puffer zugegeben und die Proben 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Zentrifugation bei Raumtemperatur wurden 20 $\mu$  pro Spur aufgetragen. Als Proteinstandard wurden 5 $\mu$ l Precision Plus Protein Dual Color Standard verwendet. Anschließend wurden die Proteine bei 130V aufgetrennt.

### 2.11.4 Western Blot

Der Proteintransfer aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte nach dem semi-dry Blotverfahren. Nach SDS-Polyacrylamidelektrophorese (wie unter 2.11.3 beschrieben) wurde das Gel in Blotpuffer überführt und anschließend ein Blotsandwich, bestehend aus zwei mit Blotpuffer getränkten Filterpapieren, einer mit Blotpuffer benetzten Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamidgel und zwei weiteren Filterpapieren, aufgebaut. Etwaig vorhandene Luftblasen wurden durch Abrollen einer serologischen Pipette aus dem Blotsandwich herausgedrückt und anschließend bei 15V für 90 Minuten geblottet.

Nach Abschluss des Blotvorganges wurde die Membran fünf Minuten mit Ponceaurot gefärbt. Zur Visualisierung der Proteine wurde in TBST so lange entfärbt bis die Proteine gut erkennbar waren. Anschließend wurde der Proteinstandard mit einem Kugelschreiber markiert und die Membran für die entsprechenden Antikörperfärbungen zurechtgeschnitten. Zur Abschätzung der Proteinmenge in jeder Gelspur wurde für jedes Gel ein sogenanntes „housekeeping“-Protein mitgefärbt. Diese Proteine sind in allen Zellen in der Regel stark exprimiert und variieren auch unter unterschiedlichen physiologischen Zuständen in ihrer Expression kaum. Damit lässt sich eine bessere Abschätzung der pro Spur aufgetragenen Proteingesamtmenge erreichen und erlaubt einen direkten Vergleich der Expressionsstärke in verschiedenen Ansätzen auf dem gleichen Gel.

Im nächsten Schritt wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur in TBST mit zusätzlich 5% Magermilchpulver (MMP) oder 5% BSA geblockt. Die verwendete Blocklösung war abhängig vom verwendeten Antikörperpaar. Anschließend wurde bei 4°C über Nacht der Primärantikörper inkubiert. Nach Abnehmen des Primärantikörpers wurden die Membranteile drei Mal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut drei Mal mit TBST gewaschen. Danach wurden die Blots mit ECL-Reagenz entwickelt. Dafür wurden beide Reagenzien 1:1 kombiniert und vorsichtig auf der Membran verteilt, bis diese vollständig benetzt war. Die Chemilumineszenz wurde mit einer Photomultiplierkamera gemessen und die Bilder digital gespeichert.

Für die Entwicklung weiterer Proteine auf der gleichen Membran wurde optional die Membran „gestript“ und erneut mit einem Primärantikörper wie oben beschrieben inkubiert.

## 2.12 Molekularbiologie

### 2.12.1 RNA-Isolation für mRNA Expressionsanalysen

Zur Beurteilung der transkriptionellen Aktivierung des Wnt-Signalweges, der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und des durch PPAR $\gamma$  regulierten Gens CD86 wurde mRNA für quantitative PCR-Analysen isoliert. Die RNA-Präparation wurde mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ durchgeführt.

MDMs wurden in 6-Well Schalen ausgesät und, wie unter 2.8.1.1 beschrieben, mit Pioglitazon stimuliert. Nach 24 Stunde oder 72 Stunden wurden die Zellen einmal mit 1000µl PB gewaschen und in 200µl PBS aufgenommen. Anschließend wurde nach Zugabe von 400µl Lysepuffer und Abkratzen mit einem Zellschaber lysiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und die Lyse durch vortexen für 30 Sekunden vervollständigt. Danach wurden die Lysate in eine „High Pure“ Filtersäule überführt und die RNA durch Zentrifugation bei 8000g für 15 Sekunden auf die Säule aufgetragen. Im nächsten Schritt wurde DNase I 1:10 in „DNase Incubation Buffer“ verdünnt und pro Säule mit 100µl 15 Minuten bei Raumtemperatur überschüssige DNA verdaut. Der Verdau wurde einmal mit 500µl „wash buffer I“ und zwei Mal mit „wash buffer II“ gewaschen. Dazu wurde nach Auftragen des Puffers jede Säule erneut 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Nach dem dritten Waschschrift wurde die Säule, ohne erneut Puffer aufzutragen, zentrifugiert, um Pufferreste zu entfernen. Die Eluation erfolgte mit 50µl destilliertem Wasser durch Zentrifugation für eine Minute bei 8000g in ein 1,5ml Reaktionsgefäß. Anschließend wurde die RNA-Konzentration und Qualität photometrisch mittels „Nanodrop“ überprüft. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 2.12.2 cDNA Synthese

Die RNA Proben wurden auf Eis aufgetaut und anschließend ein 1µg pro Reaktionsansatz in einem 200µl PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Danach wurden 5µl Mastermix bestehend aus „reaction Mix“ und reverser Transkriptase (BioRad) zugegeben. Die Reaktion wurde auf 20µl aufgefüllt und im Thermocycler (2.2) in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 2-10: Temperaturzyklus für cDNA Synthese

| <b>Zeit</b>       | <b>Temperatur</b> |
|-------------------|-------------------|
| 5 Minuten         | 25°C              |
| 30 Minuten        | 42°C              |
| 5 Minuten         | 85°C              |
| Temperatur halten | 4°C               |

Anschließend wurde die cDNA 1:45 mit Wasser auf eine Gesamtkonzentration von 10ng/ $\mu$ l verdünnt, in ein 0,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

### 2.12.3 qRT-PCR

Die Primerpaare der zu analysierenden Transkripte wurden in Wasser auf eine Konzentration von 5 $\mu$ M in einem Gesamtvolumen von 100 $\mu$ l vorverdünnt. Ebenso wurde eine „non-Primer-control“ ohne Primerlösung angesetzt.

Anschließend wurden pro Ansatz 0,6 $\mu$ l der Primervorverdünnung, 5,6 $\mu$ l SYBR Mix und 1,8 $\mu$ l Wasser zum Mastermix zusammenpipettiert. Als nächstes wurde die cDNA erneut 1:1 verdünnt auf 5ng/ $\mu$ l. Auch hier wurde eine „non-template-control“ angelegt, die keine cDNA enthielt. In einer 384-Well Platte wurden nun 8 $\mu$ l/Well des jeweiligen primerspezifischen Mastermixes in Zeilen vorgelegt.

Danach wurde die Platte in Alufolie eingewickelt und pro Well 2 $\mu$ l der cDNA-Verdünnung nach Durchstoßen der Folie in Triplikaten zugegeben. Anschließend wurde die Folie entfernt und durch eine Taqman-Klebefolie ersetzt und der Reaktionsmix bei 4°C für drei Minuten bei 1500g abzentrifugiert. Anschließend wurde die Platte im Thermocycler vermessen. Optional wurde der Reaktionsmix bei 4°C bis zu 12 Stunden zwischengelagert.

Tabelle 2-11: Temperaturzyklus für qRT-PCR-Analyse

| Zeit        | Temperatur | Wiederholungen |
|-------------|------------|----------------|
| 12 Minuten  | 95°C       | 1              |
| 15 Sekunden | 95°C       | 40             |
| 1 Minute    | 60°C       |                |
| 15 Sekunden | 95°C       |                |
| 15 Sekunden | 60°C       | 1              |
| 15 Sekunden | 95°C       |                |

Die Auswertung erfolgte mit QuantStudio Software Version 1.4.3 von Applied Biosystems.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Toxizitätsuntersuchungen

Um den Konzentrationsbereich für die funktionellen Experimente herauszuarbeiten, wurden als erstes Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt.

##### 3.1.1 Pioglitazon wirkt nicht toxisch auf MDMs im MTT

MDMs wurden, wie unter 2.7 beschrieben, isoliert und kultiviert. Zur Bestimmung der Toxizität erfolgte eine Titration der Pioglitazondosis. Die Stimulation wurde nach 24 Stunden und nach 72 Stunden beendet.

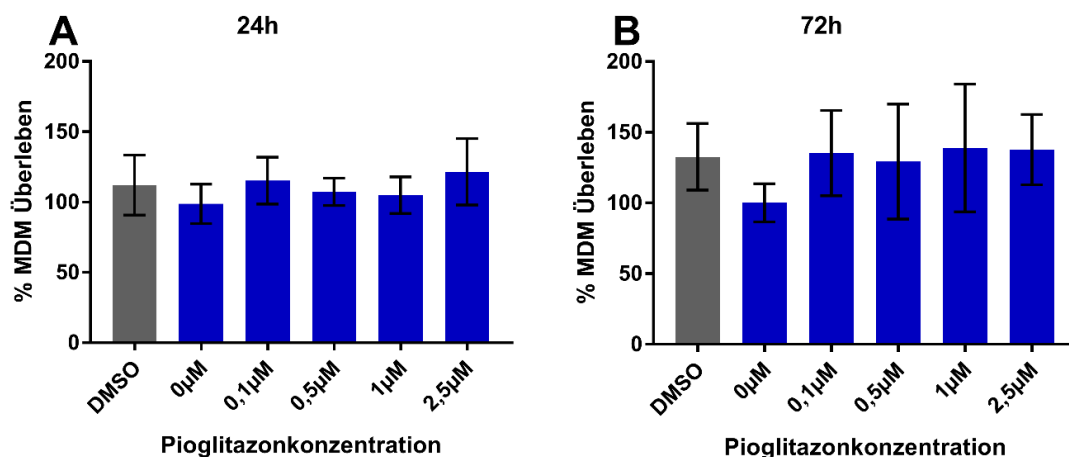


Abbildung 3.1: MTT-Assay muriner MDMs nach Stimulation mit Pioglitazon für 24h (A) und 72h (B).

Sowohl nach 24h Pioglitazonstimulation (Abbildung 3.1 A) als auch nach 72h Pioglitazonstimulation (Abbildung 3.1 B) ist kein toxischer Effekt erkennbar. Ein Grund dafür könnte sein, dass dies methodisch durch den MTT bedingt war, da dieser Test die mitochondriale Reduktaseaktivität der Zellen als Surrogatparameter der Zellvitalität erfasst und Pioglitazon als Antidiabetikum mit einem Einfluss auf den mitochondrialen Metabolismus diesen Test verfälscht (42, 43). Anstelle des Reduktionspotentials der Zellen wurde zusätzlich die Proliferationsfähigkeit der Zellen als Surrogatparameter für die Toxizität herangezogen.

##### 3.1.2 Pioglitazon zeigt eine dosisabhängige Toxizität auf MDMs im BrdU-Assay

MDMs wurden, wie unter 2.8.1.1 beschrieben, für 72 Stunden mit verschiedenen Pioglitazonkonzentrationen stimuliert. Aufgrund der geringen Proliferationsaktivität von

Makrophagen wurde auf einen 24 Stunden-Zeitpunkt verzichtet. Bei diesem Test zeigte sich jedoch zusätzlich eine erhebliche DMSO-Toxizität (Abbildung 3.2 A). Aus diesem Grund wurde für jede DMSO-Menge ein entsprechender Kontrollansatz bei Experimenten mit Pioglitazon hinzugefügt.

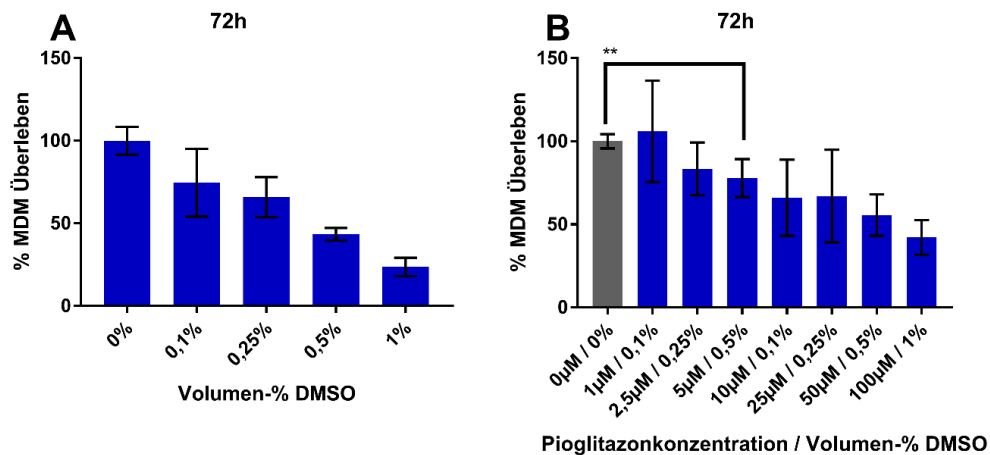


Abbildung 3.2: Einfluss von DMSO allein (A) und Pioglitazon in DMSO gelöst (B) auf die Proliferation von MDMs im BrdU-Assay nach 72h. Signifikanzanalyse mit Student's t-Test: \*\* p<0,01.

Ab einer Konzentration von  $\geq 5\mu\text{M}$  (Abbildung 3.2 B) beginnt Pioglitazon die Proliferation von MDMs erheblich zu beeinflussen. Entsprechend wurde für weitere Experimente ein Konzentrationsbereich zwischen  $0,1\mu\text{M}$  und  $1,0\mu\text{M}$  gewählt. Ab diesem Zeitpunkt konnte mit einer konstanten DMSO-Menge entsprechend 0,1 Volumenprozent (Abbildung 3.2 A) gearbeitet werden. Außerdem entspricht dies in etwa der pharmakologisch erreichbaren Plasmakonzentration von ca.  $1\mu\text{M}$  (44).

### 3.1.3 Pioglitazontoxizität auf die murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4. und 4T1 im MTT-Assay

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Pioglitazontoxizität bei den murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 und 4T1. Die getesteten Konzentrationen beschränkten sich auf  $0,1\mu\text{M}$  bis  $2,5\mu\text{M}$ , da für diese Arbeit nur Effekte innerhalb der durch MDMs tolerierten Konzentrationsspanne interessant sind.

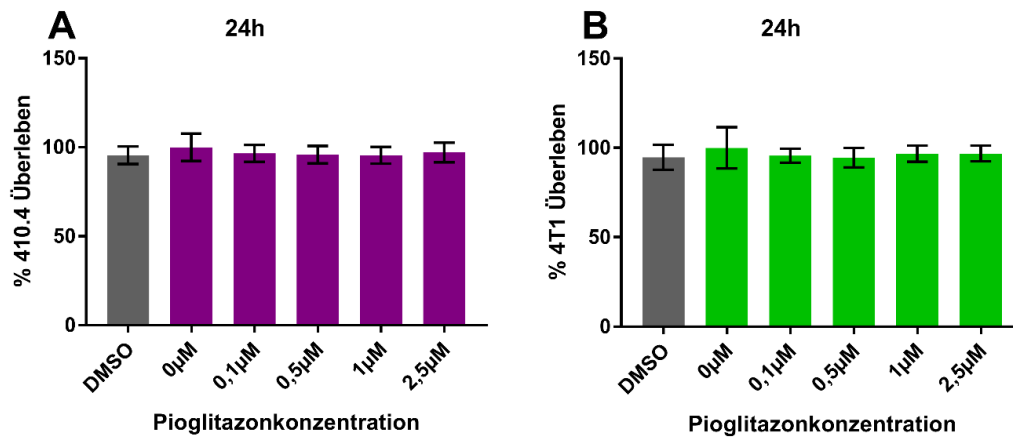


Abbildung 3.3: Einfluss von Pioglitazon auf das Zellüberleben der murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 (A) und 4T1 (B) im MTT-Assay nach 24h

Weder DMSO noch Pioglitazon zeigten nach 24 Stunden (Abbildung 3.3) einen Einfluss auf das mitochondriale Reduktionspotential der beiden Zelllinien.

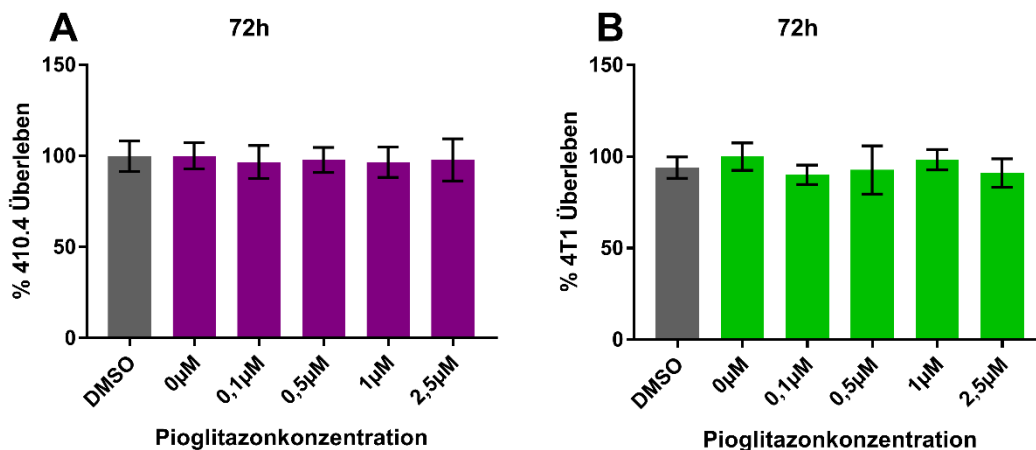


Abbildung 3.4: Einfluss von Pioglitazon auf das Zellüberleben der murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 (A) und 4T1 (B) im MTT-Assay nach 72h.

Auch nach 72 Stunden Stimulation kann man keine Toxizitätserscheinungen erkennen (Abbildung 3.4).

### 3.1.4 Pioglitazontoxizität auf die murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 und 4T1 im BrdU-Assay

Weiter wurde überprüft, ob Pioglitazon in diesen Konzentrationen einen Einfluss auf die Proliferation der murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 und 4T1 hat. Aufgrund der hohen Proliferationsrate beider Zelllinien wurde auf einen 72 Stunden-Zeitpunkt verzichtet. Nach 72 Stunden waren die Zellen entweder extrem dicht gewachsen und



der Test war im Sättigungsbereich angekommen oder die initial ausgesäte Zellzahl war derart gering, dass die Zellen nicht mehr ausreichend anwuchsen.

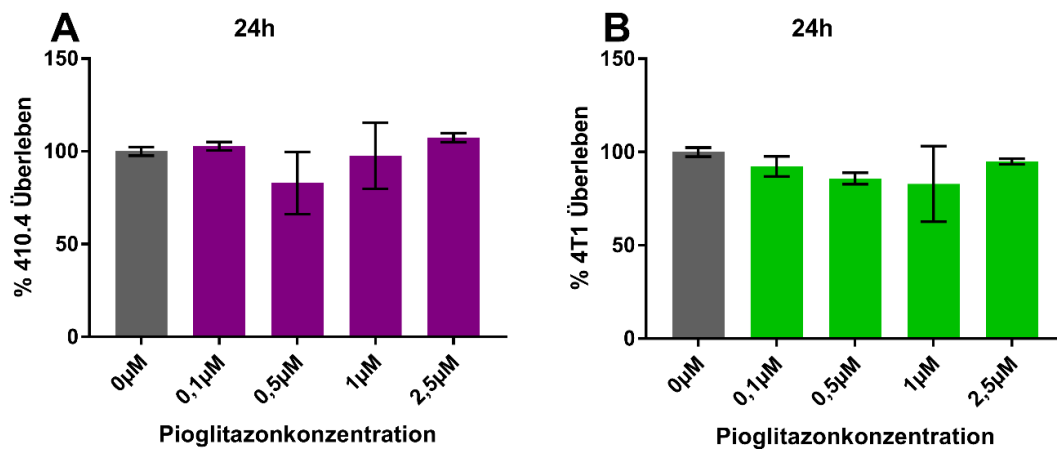


Abbildung 3.5: Einfluss von Pioglitazon auf das Zellüberleben der murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 (A) und 4T1 (B) im BrdU-Assay nach 24h.

Auch im BrdU-Assay kann kein toxischer Effekt von Pioglitazon nachgewiesen werden. Die verwendeten DMSO-Konzentrationen haben ebenfalls keinen erkennbaren Effekt auf die Zelllinien (Abbildung 3.6).

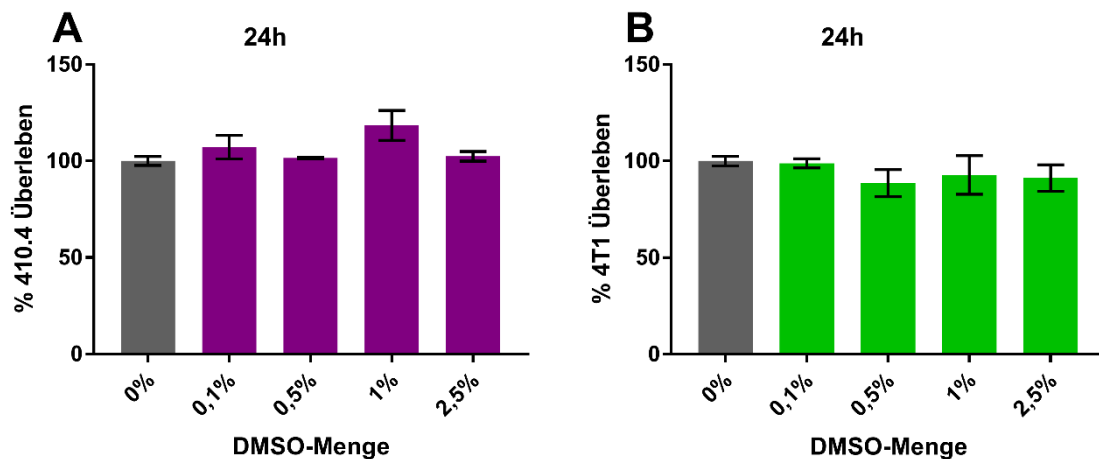


Abbildung 3.6: Einfluss von DMSO auf das Zellüberleben der murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 (A) und 4T1 (B) im BrdU-Assay nach 24h.

### 3.2 Morphologie Pioglitazon-stimulierter MDMs

Primär war von Interesse, ob sich ein morphologischer Unterschied bei Makrophagen nach Stimulation mit Pioglitazon im Vergleich zu unstimulierten und LPS-stimulierten Kontrollen darstellen lässt. Dabei wurde neben Hellfeldmikroskopie auch das Zytoskelett mittels Immunfluoreszenz das Zytoskelett mit Phalloidin gefärbt. Außerdem

wurde E-Cadherin angefärbt, da dieses, laut Literatur, den Polarisationsphänotyp mit charakterisiert. Eine erhöhte E-Cadherinexpression deutet auf einen alternativ aktivierten, antiinflammatorischen Makrophagen hin (45).

### 3.2.1 Pioglitazon beeinflusst die Morphologie von MDMs nicht

Der Aktivierungszustand von Makrophagen, insbesondere klassisch aktivierte Makrophagen, zeigen eine veränderte Morphologie. Dies erkennt man in Abbildung 3.7 in der oberen Reihe. Das Zellbild von mit LPS klassisch aktivierten Makrophagen (rechtes Bild) ist deutlich unruhiger mit unschärfer begrenzten Zellrändern und kürzeren Ausläufern und dunklerem Zytoplasma als bei mit DMSO behandelten Makrophagen (linkes Bild). Nach 24 Stunden Stimulation mit Pioglitazon verändert sich die Morphologie leicht (Abbildung 3.7 unter Reihe). Die Zellbegrenzungen werden mit steigender Pioglitazonkonzentration etwas unruhiger. Der Zellkörper behält aber seine langgestreckte Form wie bei den mit DMSO behandelten Zellen.

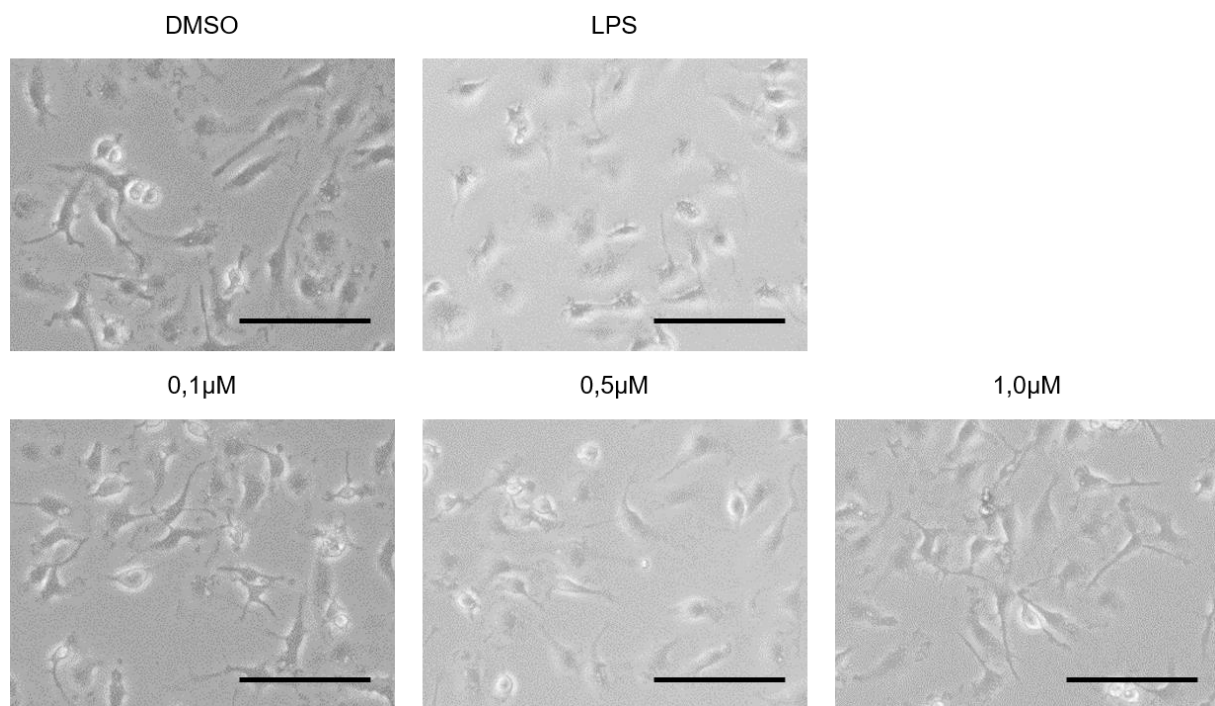


Abbildung 3.7: MDMs nach 24h mit Pioglitazon, Abbildungen repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 100µm.

Nach 72 Stunden ist die Zelldichte erwartungsgemäß angestiegen. Die Zellen liegen dichter beieinander und haben mehr Kontakt (Abbildung 3.8).

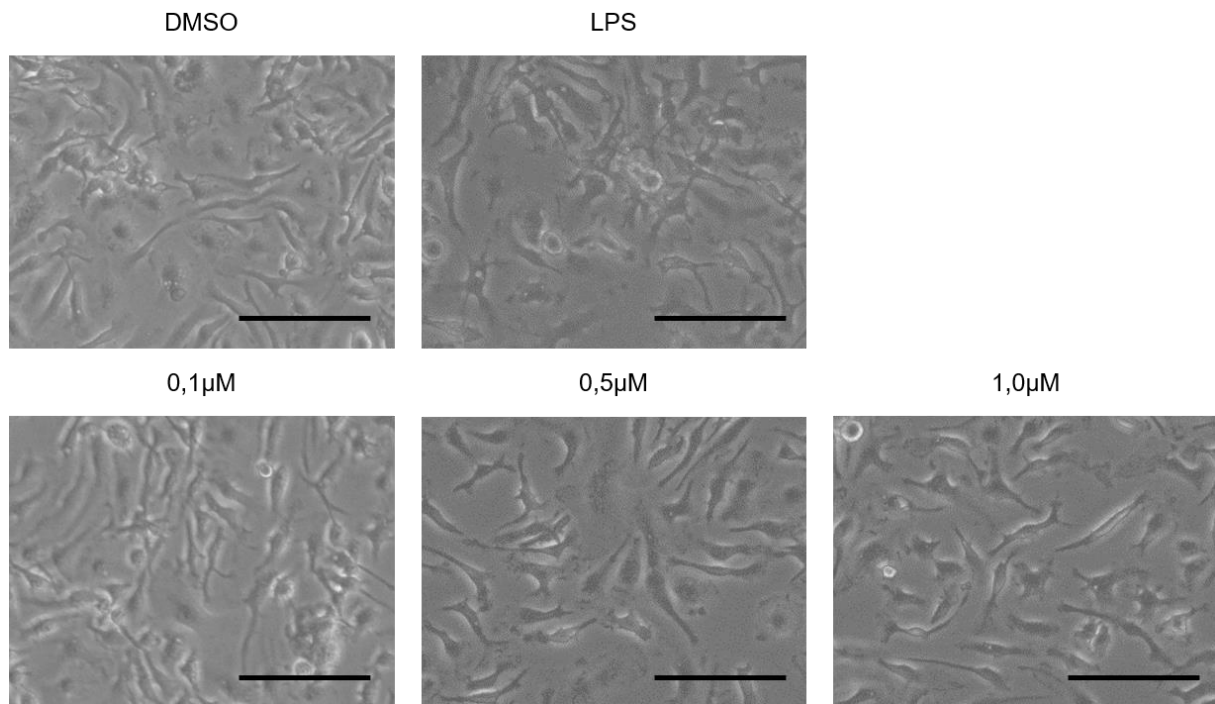


Abbildung 3.8: MDMs nach 72h mit Pioglitazon. Abbildungen repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Vergrößerung 100-fach, Größenmaßstab 100µm.

Der morphologische Effekt der Stimulation mit LPS auf die MDMs lässt sich auch nach 72 Stunden Stimulation noch gut von den mit DMSO behandelten Zellen abgrenzen (Abbildung 3.8 obere Reihe). Die mit Pioglitazon stimulierten MDMs haben nach 72 Stunden ihre Morphologie wieder der nur mit DMSO stimulierter Zellen angeglichen. Der nach 24 Stunden vermutete Dosiseffekt durch Pioglitazon lässt sich hier ebenfalls nicht nachvollziehen (Abbildung 3.8 untere Reihe).

### 3.2.2 Pioglitazon beeinflusst das Zytoskelett von MDMs nicht

Phalloidin bindet vor allem an filamentöses Aktin und eignet sich daher gut zur Darstellung des Zytoskeletts. Durch Konjugation mit einem Fluorophor kann das Zytoskelett fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Das in Rot gefärbte Zytoskelett zeigt eine intensive Färbung in den Zellkörpern. Die für Makrophagen typischen Ausläufer färben sich ebenfalls gut an (Abbildung 3.9).

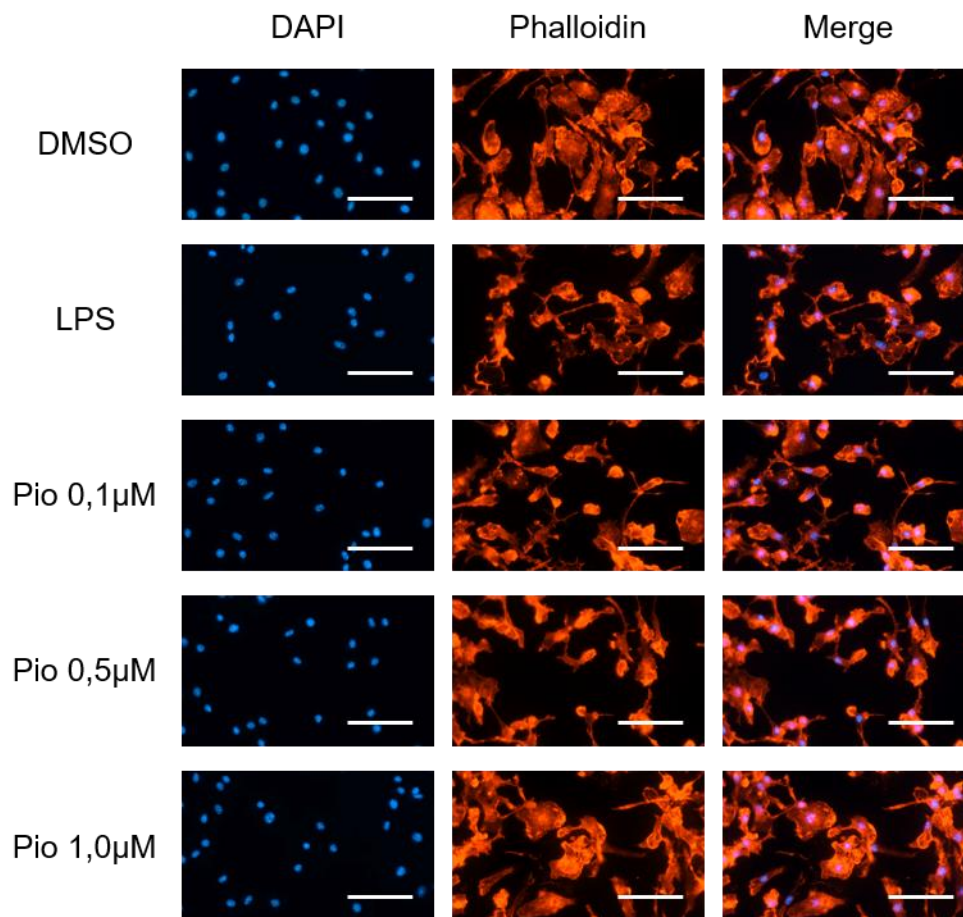


Abbildung 3.9: Phalloidininfärbung Pioglitazon-stimulierter MDMs nach 24h. linke Spalte Kerngegenfärbung mit DAPI in Blau; mittlere Spalte Phalloidininfärbung in Rot; rechte Spalte Bildfusion aus Phalloidin und DAPI; Vergrößerung 100x, Größenmaßstab 400µm. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Vergleicht man die verschiedenen Ansätze untereinander, so zeigt sich kein morphologischer Unterschied zwischen Pioglitazon-stimulierten MDMs und der DMSO-Kontrolle. Auch die mit LPS stimulierten Makrophagen zeigen keine morphologische Veränderung in der Phalloidininfärbung nach 24 Stunden (Abbildung 3.9). Nach 72 Stunden zeigt sich eine deutlich erhöhte Zelldichte ohne dass die Zellen überkonfluent erscheinen. Nach Stimulation mit LPS sind Aggregate aus mehreren Zellen zu erkennen, die keine Trennung der Zellgrenzen mehr erkennen lassen. In Verbindung mit der Kerngegenfärbung erscheinen diese fusioniert zu einem Synzitium. (Abbildung 3.10, zweite Reihe). Interessanterweise kann dieses Phänomen auch bei der DMSO-Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 3.10, erste Reihe). Dagegen sind die Zellkörper der MDMs, die mit Pioglitazon behandelt wurden, weiterhin gut voneinander abgrenzbar (Abbildung 3.10, Reihe 3 bis 5). Fusionierte Zellen kommen nicht vor.

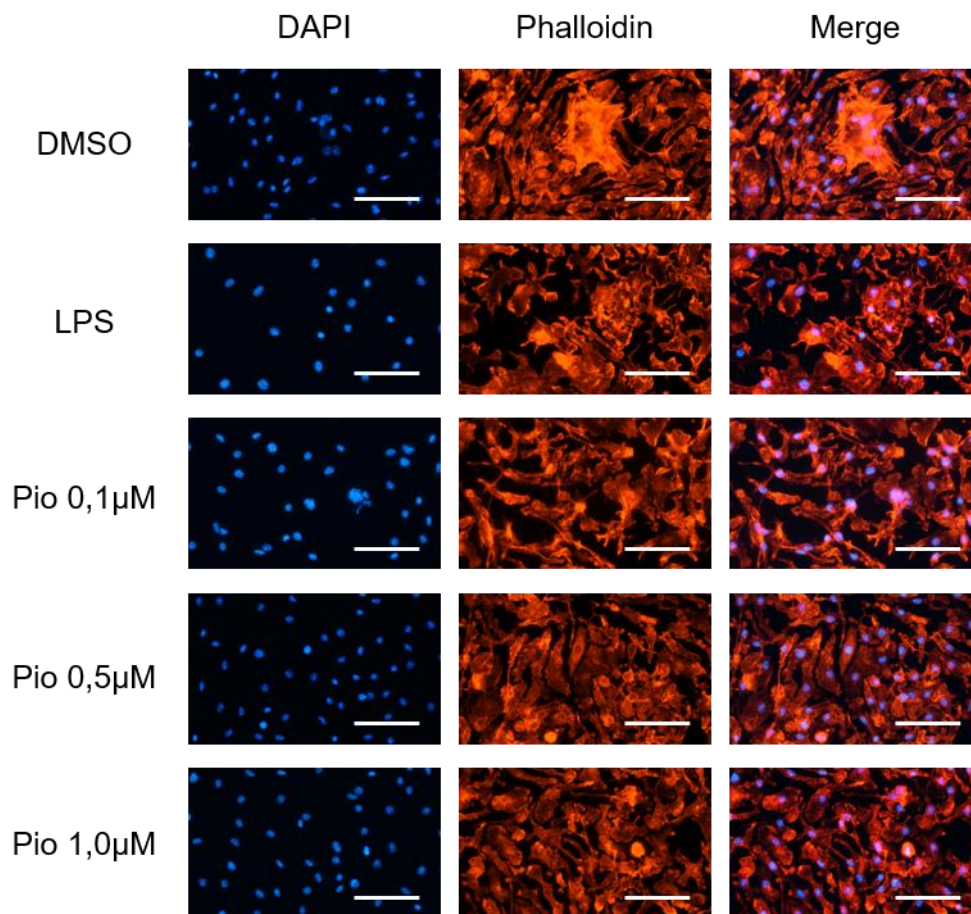


Abbildung 3.10: Phalloidinfärbung Pioglitazon-stimulierter MDMs nach 72h. Linke Spalte Kerngegenfärbung mit DAPI in Blau; mittlere Spalte Phalloidinfärbung in Rot; rechte Spalte Bildfusion aus DAPI und Phalloidin; Vergrößerung 100x, Größenmaßstab 400µm. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

### 3.2.3 Pioglitazon beeinflusst die zelluläre Verteilung von E-Cadherin in MDMs nicht

Das Zell-Zell-Kontaktprotein E-Cadherin hat neben seinen zytoskelettalen Eigenschaften auch Einfluss auf die Wnt-Signalkaskade. In Makrophagen ist es ein Marker für alternativ aktivierte Makrophagen (45). Deshalb sollte mit Immunfluoreszenz die Verteilung von E-Cadherin in MDMs untersucht werden. 410.4-Zellen zeigen als epitheliale Zellen eine kräftige, membranständige Expression von E-Cadherin (Abbildung 3.11, erste Reihe). Dagegen wird E-Cadherin in MDMs nur sehr schwach exprimiert (Abbildung 3.11, mittlere Spalte). Da sich die 410.4 Zellen gut anfärben ließen, ist nicht von einem technischen Problem bei der Färbung auszugehen. Bei Stimulation mit LPS ist E-Cadherin hauptsächlich im Zellkörper

darstellbar, da sich die Zellen abrunden und die Zellausläufer kleiner werden (Abbildung 3.11 dritte Reihe). Bei Stimulation mit Pioglitazon ist E-Cadherin etwas besser in den Zellausläufern erkennbar. Dies könnte entweder für eine vermehrte Expression des Proteins sprechen oder lediglich zeigen, dass die Zellen ihre langgestreckte Morphologie behalten. Eine Umverteilung an die Membran, wie bei den epithelialen 410.4, ist nicht zu erkennen (Abbildung 3.11). Ein Dosisseffekt von Pioglitazon auf die E-Cadherinexpression ist nicht erkennbar nach 24 Stunden.

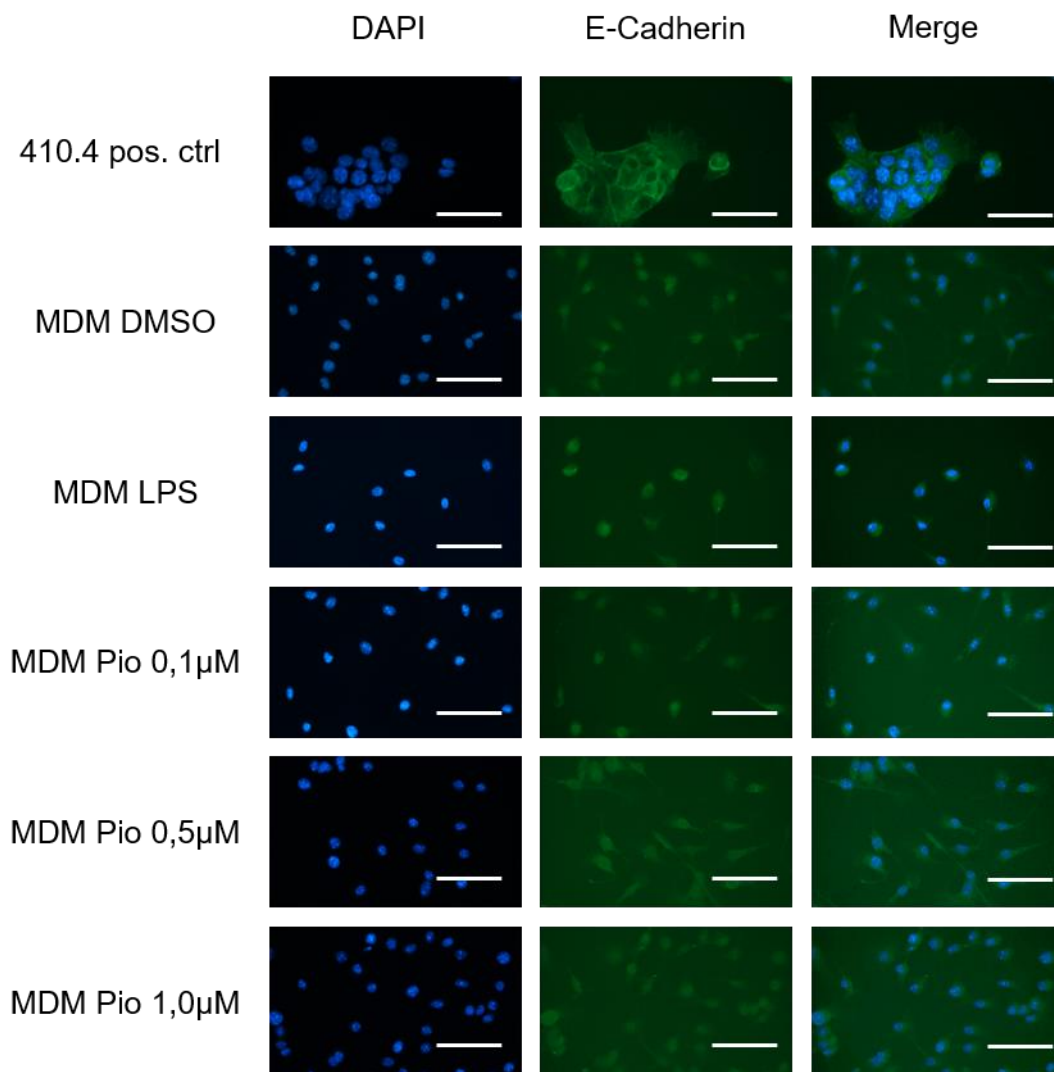


Abbildung 3.11: E-Cadherininmunfluoreszenzmikroskopie nach 24h Stimulation mit Pioglitazon (Pio), Positivkontrolle im obersten Panel mit 410.4-Zellen. Linke Spalte Kerngegenfärbung in Blau; mittlere Spalte E-Cadherinfärbung in Grün; rechte Spalte Bildfusion aus DAPI und E-Cadherin; Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für 3 unabhängige Wiederholungen. Vergrößerung 400x, Größenmaßstab 100µm.



Auch nach 72 Stunden ist nur eine sehr schwache E-Cadherin-Expression nach Stimulation mit Pioglitazon mittels Immunfluoreszenz darstellbar. Es zeigt sich ein identisches Bild zu Abbildung 3.11 mit deutlicherer Darstellung der Zellausläufer bei den mit Pioglitazon stimulierten MDMs. Es ist zu vermuten, dass die E-Cadherinexpression in Pioglitazon stimulierten MDMs nicht ausreichend hoch ist, um Unterschiede mittels Immunfluoreszenz darstellen zu können.

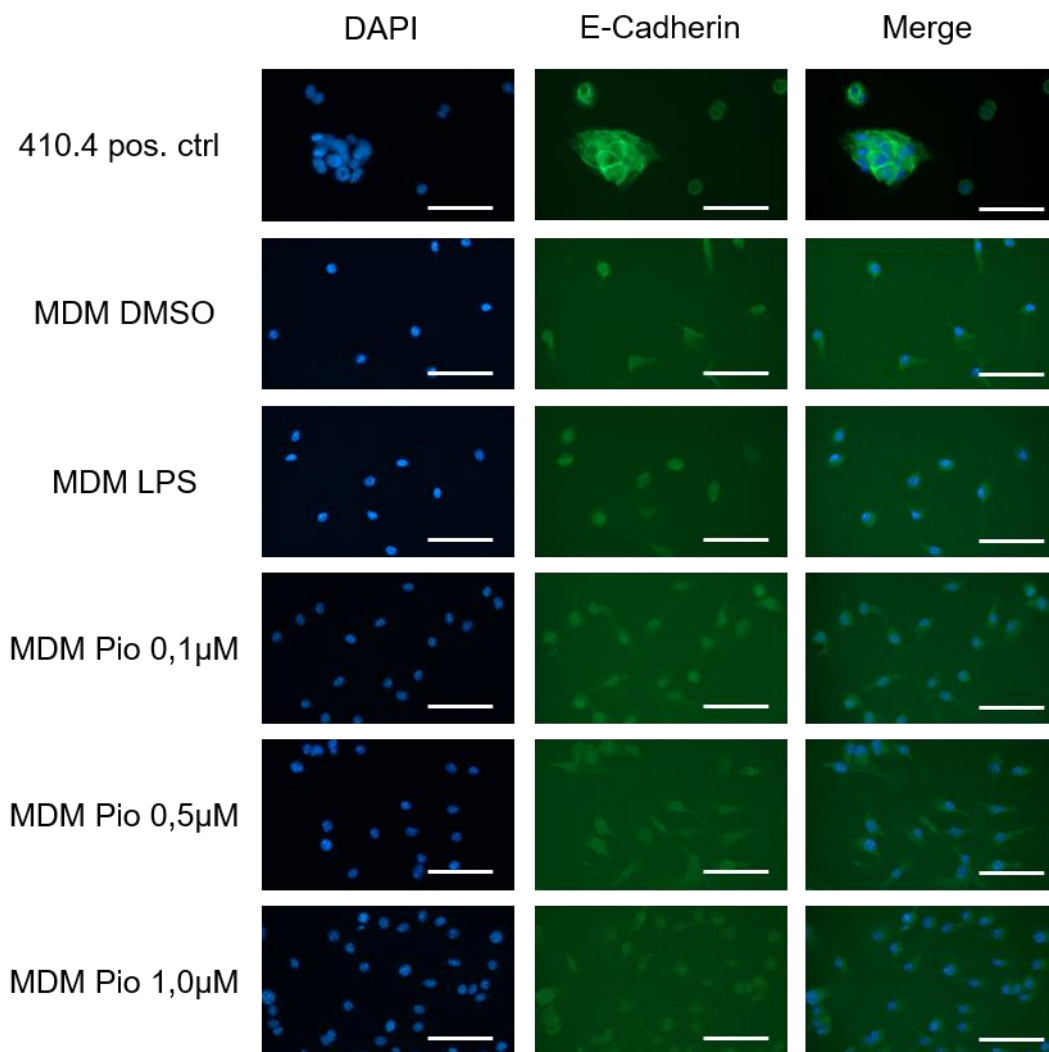


Abbildung 3.12: E-Cadherinimmunfluoreszenzmikroskopie nach 72h Stimulation mit Pioglitazon (Pio), Positivkontrolle im obersten Panel mit 410.4-Zellen. Experiment repräsentativ für 2 unabhängige Wiederholungen. Vergrößerung 400x, Größenmaßstab 100µm.

### 3.3 Western Blot Analysen von Pioglitazon stimulierten MDMs, 4T1-Zellen und 410.4-Zellen

Für eine funktionale Untersuchung der Aktivität des Wnt und PI3K-Signalweges unter Stimulation mit Pioglitazon folgten Western Blot Analysen.  $\beta$ -Catenin verbindet funktional Wnt-Signalweg mit E-Cadherin, so dass auch dieses gefärbt wurde (45).

#### 3.3.1 Pioglitazon erhöht dosisabhängig die Expression von E-Cadherin in MDMs

LPS unterdrückt, wie in der Literatur beschrieben, die E-Cadherinexpression (46). Bei den mit Pioglitazon behandelten MDMs erkennt man bereits nach 24 Stunden eine Zunahme der E-Cadherinexpression in MDMs (Abbildung 3.13 A). Nach 72 Stunden ist der Effekt noch deutlicher ausgeprägt (Abbildung 3.13 B).

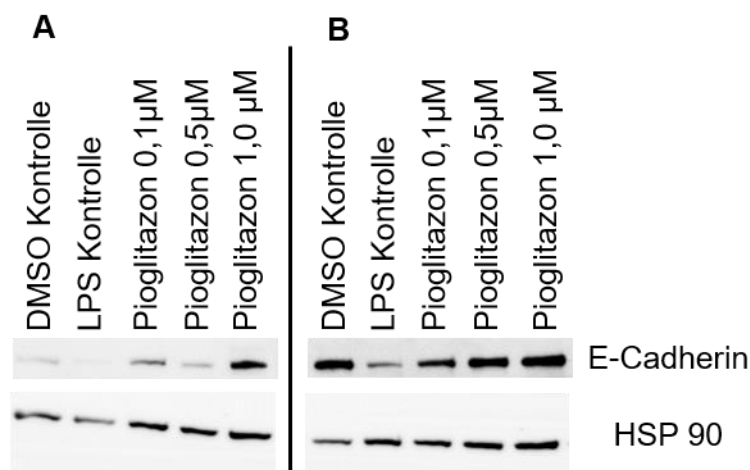


Abbildung 3.13: Western Blot Analyse der E-Cadherin Expression in MDMs, stimuliert mit DMSO, LPS und Pioglitazon; A: 24h Stimulation; B: 72h Stimulation. Ladekontrolle mit HSP 90 zur Abschätzung Proteinmenge pro Gelspur. Blot repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

#### 3.3.2 Pioglitazon hat keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in den murinen Mammakarzinomzelllinien 410.4 und 4T1

Bei 410.4 Zellen kann man keine Zu- oder Abnahme der E-Cadherinmenge feststellen. Auch LPS hat keinen Effekt auf die E-Cadherinexpression (Abbildung 3.14).



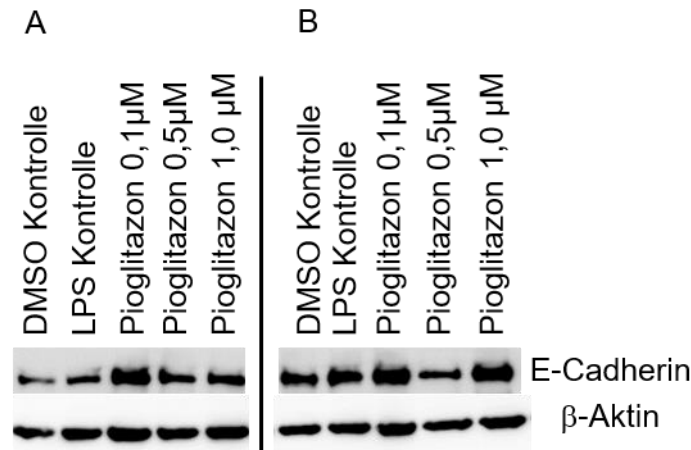


Abbildung 3.14: Western Blot Analyse der E-Cadherin Expression in der murinen Mammakarzinomzelllinie 410.4 nach A: 24h und B: 72h Stimulation mit Pioglitazon; Ladekontrolle mit  $\beta$ -Aktin.

In Abbildung 3.14 A kann man nach Stimulation mit 0,1µM Pioglitazon eine Zunahme der E-Cadherinmenge erkennen. Vergleicht man jedoch die Ladekontrolle mit den anderen Gespuren, so ist in dieser Spur mehr Protein aufgetragen worden, so dass der Effekt kein biologischer, sondern ein technischer zu sein scheint. Entsprechend kann man bei den höheren Pioglitazonkonzentrationen auch keinen Effekt mehr erkennen.

Bei der 4T1 Zelllinie hat LPS nach 24 Stunden eine Induktion von E-Cadherin bewirkt (Abbildung 3.15 A). Nach 72 Stunden ist der Effekt bereits wieder abgeklungen (Abbildung 3.15 B). Eine Behandlung mit Pioglitazon nimmt jedoch wie bei den 410.4-Zellen keinen Einfluss auf die Expression von E-Cadherin.

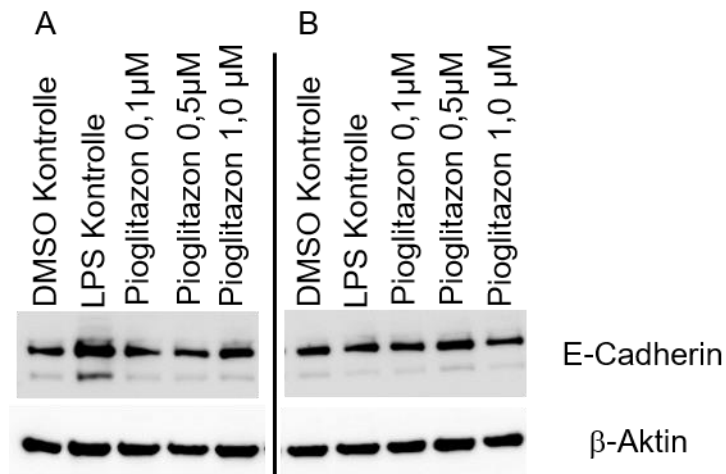


Abbildung 3.15: Western Blot Analyse der E-Cadherin Expression in der murinen Mammakarzinomzelllinie 4T1 nach A: 24h und B: 72h Stimulation mit Pioglitazon; Ladekontrolle mit  $\beta$ -Aktin.

### 3.3.3 Pioglitazon führt nicht zu einer Aktivierung von $\beta$ -Catenin in MDMs

E-Cadherin ist über GSK3 $\beta$  mit dem Wnt Signalweg verbunden (47). Da TAMs über den Wnt-Signalweg die Metastasierung begünstigen, wurde die Aktivität des Wnt-Signalweges in MDMs per Western Blot untersucht (20). Die oben gezeigte Steigerung der E-Cadherinexpression könnte auf diese Weise in den Wnt-Signalweg eingreifen.  $\beta$ -Catenin ist normalerweise an E-Cadherin gebunden. Nach Phosphorylierung wird aktiviertes  $\beta$ -Catenin vor proteasomalem Abbau geschützt und kann im Zellkern Transkriptionsvorgänge aktivieren (48).

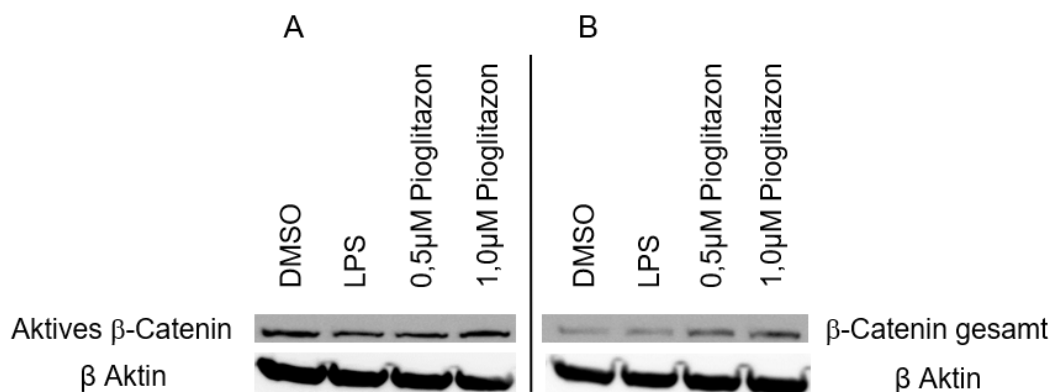


Abbildung 3.16: Western Blot Analyse der  $\beta$ -Catenin Expression in MDMs nach 24h Inkubation mit Pioglitazon A: aktives  $\beta$ -Catenin und B:  $\beta$ -Catenin gesamt. Ladekontrolle mit  $\beta$ -Aktin.

Es zeigt sich kein Unterschied in der Aktivierung des  $\beta$ -Catenins im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach 24 Stunden Inkubation mit Pioglitazon (Abbildung 3.16).

Lediglich die Gesamtmenge des Proteins scheint etwas zuzunehmen, was sich mit der Zunahme der oben gezeigten E-Cadherinexpression erklären ließe (Abbildung 3.13).

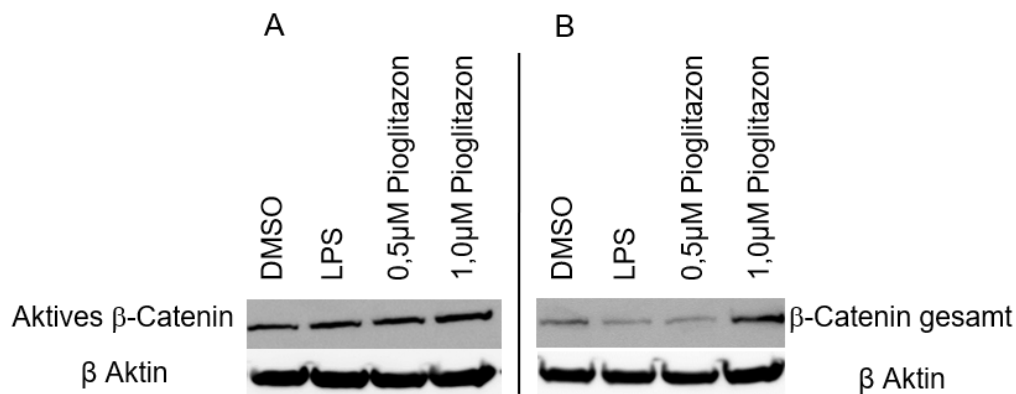


Abbildung 3.17: Western Blot Analyse der β-Catenin Expression in MDMs nach 72h Inkubation mit Pioglitazon A: aktives β-Catenin und B: β-Catenin gesamt. Ladekontrolle mit β-Aktin

Auch nach 72 Stunden ist kein Effekt auf die Aktivierung von β-Catenin zu erkennen (Abbildung 3.17). Nach 72 Stunden scheint bei 0,5μM Pioglitazon die Menge an gesamtem β-Catenin deutlich geringer als bei 1μM Pioglitazon zu sein (Abbildung 3.17 B). Die Ladekontrolle kommt hier aber auch etwas schwächer zur Darstellung, so dass die Gesamtmenge an aufgetragenem Protein etwas geringer ist.

### 3.3.4 Pioglitazon hat keinen aktivierenden Effekt auf Akt und GSK3β

Im nächsten Schritt wurde die Beteiligung des PI3K/Akt Signalweges in Bezug auf Pioglitazon mittels Western Blot untersucht.

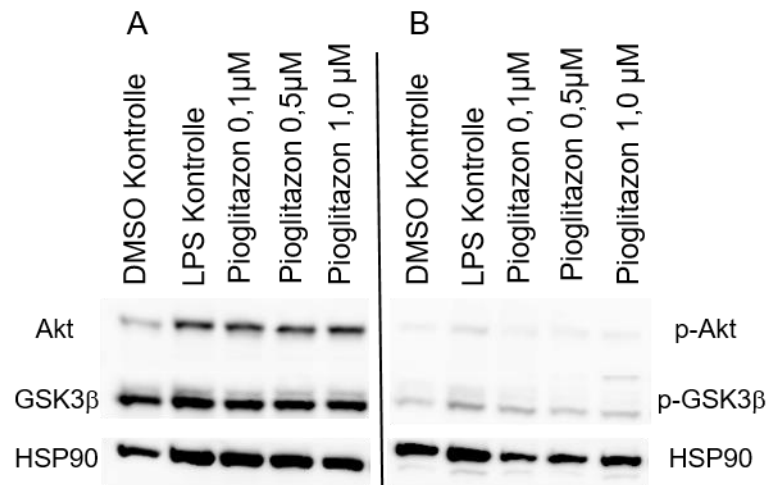


Abbildung 3.18: Western Blot Analyse der Expression von Akt und GSK3β (A) nach 24h Stimulation mit Pioglitazon in MDMs und des Phosphorylierungszustandes von Akt und GSK3β (B). Ladekontrolle mit HSP 90

Während LPS eine geringe Phosphorylierung von Akt und GSK3β zu verursachen mag (Abbildung 3.18 B), hat Pioglitazon keinen aktivierenden Effekt. Die Expressionslevel der Proteine sind nicht verändert.

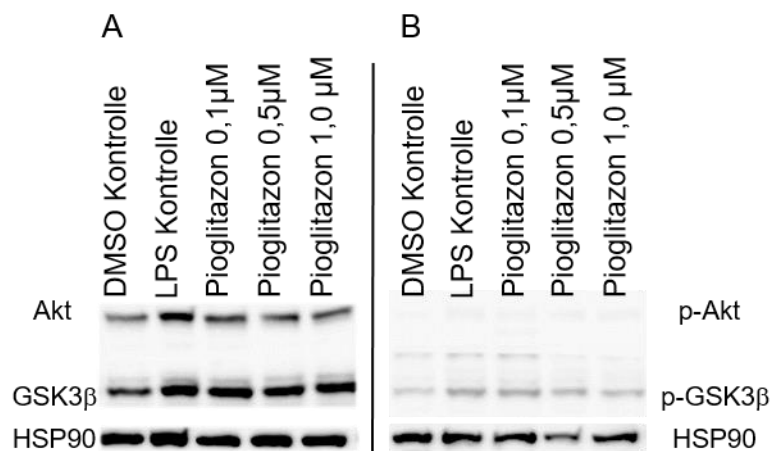


Abbildung 3.19: Western Blot Analyse der Expression von Akt und GSK3β (A) nach 72h Stimulation mit Pioglitazon in MDMs und des Phosphorylierungszustandes von Akt und GSK3β (B) nach 72h Pioglitazonstimulation in MDMs. Ladekontrolle mit HSP 90

Auch nach 72 Stunden ist hier kein Effekt erkennbar. Der Effekt der LPS-Stimulation ist hier ebenfalls nicht mehr nachweisbar.

### 3.4 mRNA-Expressionsanalysen mit Pioglitazon stimulierten MDMs

Neben der Regulation von Wnt, E-Cadherin und PI3K auf Proteinebene war auch die Regulation des Aktivierungszustandes der einzelnen Signalwege auf Transkriptionsebene von Interesse. Zum einen wurden  $Tnf\alpha$  und  $Il1-\beta$  als Marker für akute Entzündung untersucht. Weiter wurden Wnt6, Axin2 und Dkk2 für den Wnt-Signalweg ausgewählt. Außerdem wurde die Transkription von PPAR $\gamma$  und E-Cadherin betrachtet, um die Effekte aus dem Western Blot von einer anderen Seite zu beleuchten. Cd86 diente als Positivkontrolle, da es durch PPAR $\gamma$  induziert wird (49).

#### 3.4.1 $Tnf\alpha$ und $Il1-\beta$ werden in MDMs durch Pioglitazon nicht aktiviert

Zuerst wurde der Aktivierungszustand der Makrophagen mit qRT-PCR untersucht.

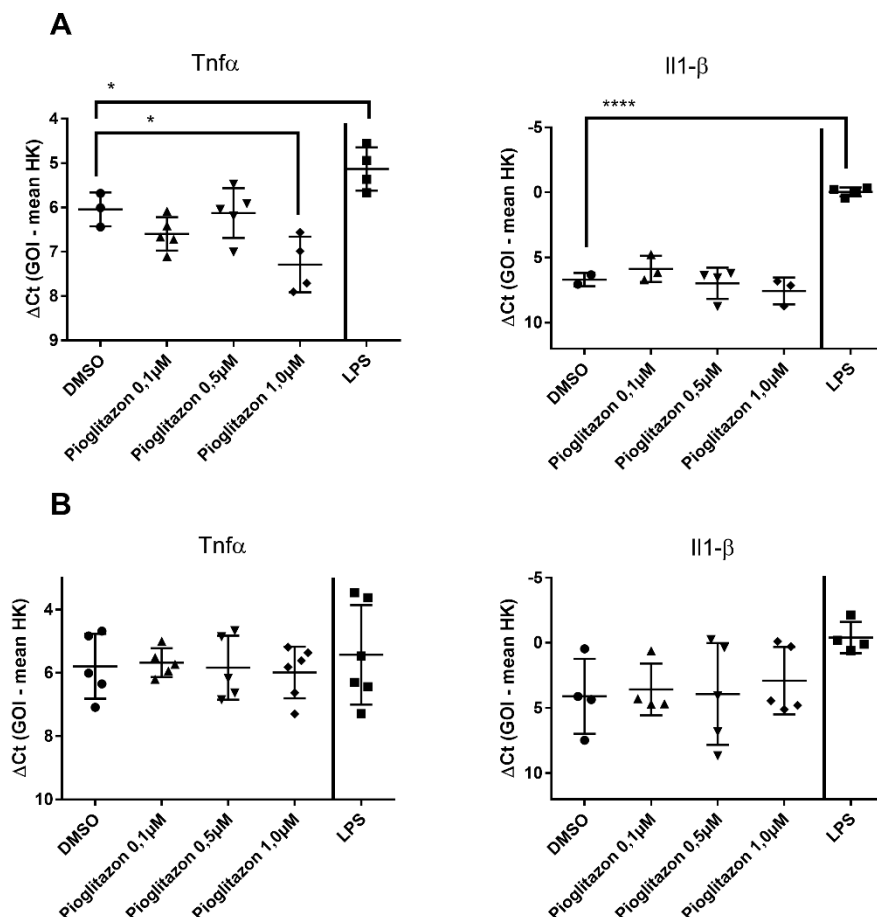


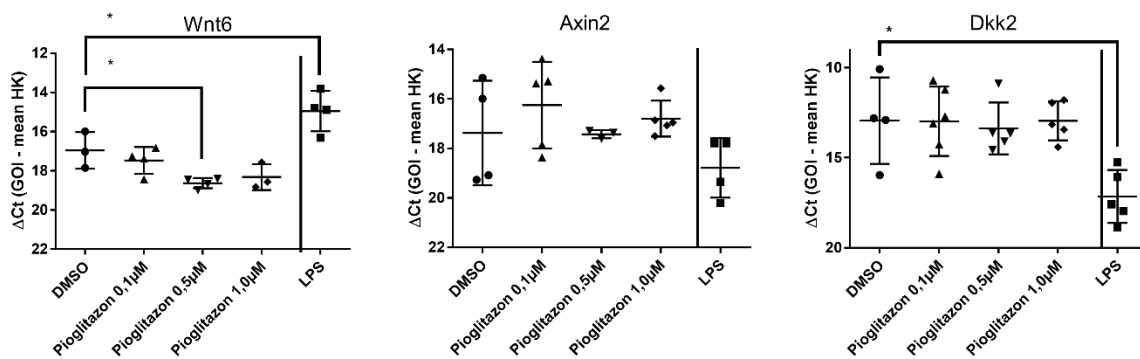
Abbildung 3.20: mRNA-Expression von  $Tnf\alpha$  und  $Il1-\beta$  in MDMs nach Pioglitazonstimulation für 24h (A) und 72h (B). Signifikanzanalyse mit Students t-Test \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Hierbei wurden zuerst die Akut-Phase Gene  $Tnf\alpha$  und  $Il1-\beta$  als Signaturgene für klassisch aktivierte Makrophagen betrachtet. Pioglitazon unterdrückt nach 24 Stunden die Transkription von  $Tnf\alpha$ , wie in Abbildung 3.20 A links dargestellt. LPS dagegen reguliert erwartungsgemäß die  $Tnf\alpha$  Transkription nach oben. Auf  $Il1-\beta$  hat Pioglitazon keinen Effekt (Abbildung 3.20 A rechts). LPS zeigt auch hier einen stark aktivierenden Effekt (Abbildung 3.20 A rechts). Nach 72 Stunden Inkubation ist kein signifikanter Einfluss von Pioglitazon oder LPS auf die beiden Gene mehr darstellbar (Abbildung 3.20 B).

### 3.4.2 Pioglitazon beeinflusst den Wnt-Signalweg in MDMs nicht

Während die Expression von *Axin2* und *Dkk2* nach 24 Stunden nach Pioglitazonstimulation unverändert bleibt (Abbildung 3.21 A Mitte und rechts), kann man einen Trend zur Herunterregulation von *Wnt6* erkennen (Abbildung 3.21 A links), der aber nicht signifikant ist (Abbildung 3.21 A).

**A**



**B**

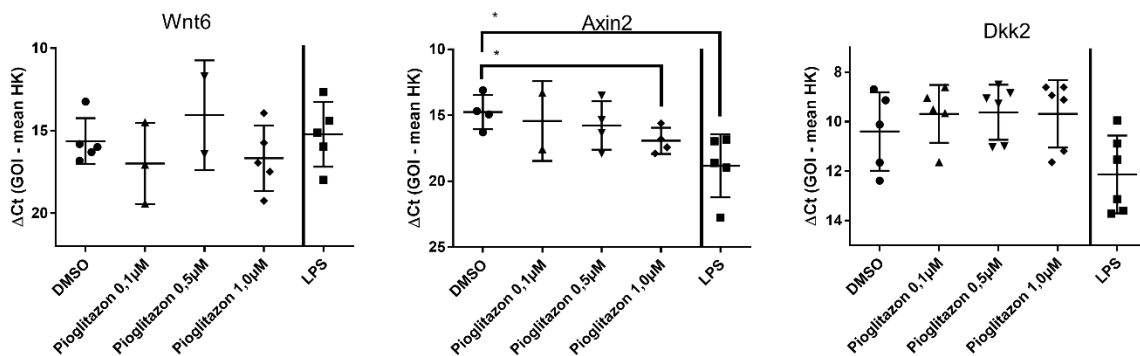


Abbildung 3.21: mRNA-Expression von *Wnt6*, *Axin2* und *Dkk2* in MDMs nach Pioglitazonstimulation für 24h (A) und 72h (B). Signifikanzanalyse mit Students t-Test \*  $p < 0,05$

Nach 72 Stunden ist keinerlei Effekt der Pioglitazonstimulation auf Wnt6 und Dkk2 erkennbar. Axin2 wird dagegen signifikant und dosisabhängig herunterreguliert. Zusammenfassend ergibt sich nach 72 Stunden kein nennenswerter Einfluss auf den Wnt-Signalweg (Abbildung 3.21 B).

### 3.4.3 Pioglitazon stabilisiert E-Cadherin nach 24h in MDMs

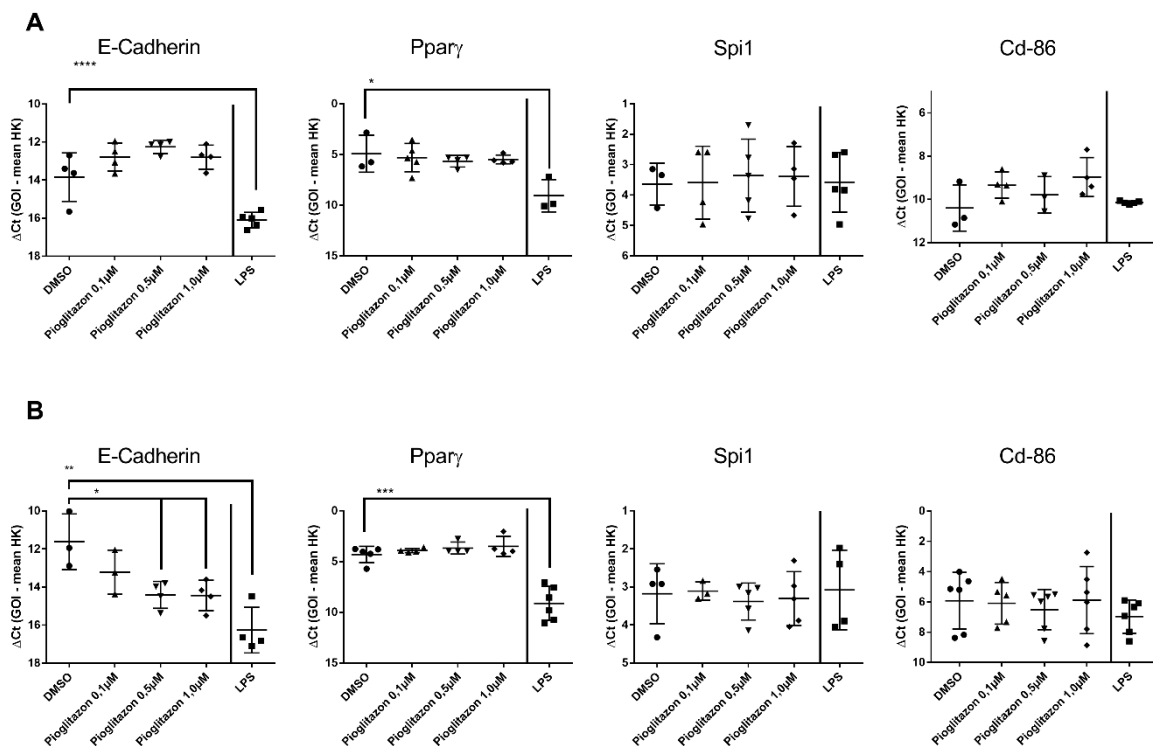


Abbildung 3.22: mRNA-Expression von E-Cadherin, PPAR $\gamma$ , Spi1 und CD-86 in MDMs nach Pioglitazonstimulation für 24h (A) und 72h (B). Signifikanzanalyse mit Students t-Test \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Die Expression von E-Cadherin auf mRNA Ebene wird durch Pioglitazon initial stabilisiert und nach 72 Stunden herunterreguliert (Abbildung 3.22 A und B, linkes Panel). LPS dagegen sorgt für eine rasche und dauerhafte Herunterregulation des E-Cadherin-Gens. PPAR $\gamma$  selbst wird auf mRNA-Ebene nicht reguliert durch Pioglitazon (Abbildung 3.22 A und B zweites Panel). Das Mausanalogue des Transkriptionsfaktors PU-1 (Spi1) wird weder durch Pioglitazon, noch durch LPS beeinflusst (Abbildung 3.22 A und B, drittes Panel). Cd86 als positiv durch PPAR $\gamma$  reguliertes Gen wird nach 24 Stunden induziert (Abbildung 3.22 A, rechtes Panel). Die Streuung der DMSO-Kontrolle ist aber derart deutlich, dass kein Signifikanzniveau erreicht werden kann.

Nach 72 Stunden ist der Effekt von Pioglitazon auf CD86 bereits nicht mehr erkennbar (Abbildung 3.22 B, rechtes Panel).



## 4 Diskussion

Die Behandlung des metastasierten TN Brustkrebses benötigt dringend innovative molekulare therapeutische Ansätze um das Überleben der Patientinnen deutlich zu verbessern. Metronome Therapieansätze, die über eine Modulation der Tumormikroumgebung, bestehend aus Stromazellen, Immuninfiltrat und extrazellulärer Matrix, wirken, könnten dem Tumor die Lebensgrundlage entziehen und so dessen effektive Behandlung ermöglichen. In dieser Arbeit wurde der potentielle, metronom biomodulatorische Therapieansatz mit Pioglitazon in seiner Wirkung auf den murinen Knochenmarksmakrophagen als Modell für TAMs vergleichend zu Mammakarzinomzellen untersucht.

### 4.1 Klinische und präklinische Erfahrungen mit Makrophagenrepolarisation und PPAR $\gamma$ -Stimulation

Es gibt bereits präklinische und klinische Erfahrungen mit Makrophagenrepolarisation und Stimulation von PPAR $\gamma$ , die eine verbesserte Tumorkontrolle zeigen konnten. Z.B. konnten Pollard et al. im Mausmodell zeigen, dass die Repolarisation von TAM in Richtung eines klassisch aktivierten Makrophagen die Tumorkontrolle signifikant im Mausmodell verbessert (33). Dabei wurde TMP 195, ein unselektiver Klasse zwei Histondeacetylaseinhibitor (HDACi), in Kombination mit einem PD1-Antagonisten verwendet. Diese Methode ist leider nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar, da es für TMP 195 keine klinischen Daten gibt. Dies zeigt aber anschaulich, wie die Modulation der Tumormikroumgebung im Speziellen des Makrophagen das Therapieansprechen verbessern kann.

Eine andere Studie von Phillippe et al. zeigt, dass Pioglitazon erfolgreich bei myeloischen Erkrankungen einsetzbar ist. Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML), die unter alleiniger Therapie mit Imatinib keine molekulare Remission erreicht hatten, konnten durch Hinzunahme von Pioglitazon eine molekulare Remission erreichen (50). Dies veranschaulicht, dass Pioglitazon die biologische Aktivität anderer Medikamente unterstützen kann und im myeloischen Kompartiment wirksam ist.

Weitere Phase II Studien für nicht-myeloische Erkrankungen haben ergeben, dass die begleitende Hinzunahme von Pioglitazon zu einer metronomen Chemotherapie ein verbessertes Ansprechen der Erkrankung nach sich ziehen kann, ohne dass dabei

direkt die Modulation des Makrophagen untersucht worden wäre (11, 35, 51). Ob diese positive, therapeutische Wirkung durch einen direkten Effekt auf die Tumorzelle begründet ist, oder ob es sich dabei um eine Modulation der Mikroumgebung handelt, ist bisher nur rudimentär untersucht. Die positiven Ergebnisse aus einer Studie mit einer myeloischen Neoplasie werfen die Frage auf, ob Pioglitazon über einen solchen Repolarisationseffekt nicht auch den der myeloischen Reihe entstammenden TAM entsprechend positiv beeinflussen kann.

#### 4.2 PPAR $\gamma$ ist mit dem Wnt-Signalweg verknüpft

PPAR $\gamma$  wird konstitutiv in Makrophagen exprimiert und ist biologisch aktiv und stellt damit ein „drugable target“ für die Induktion einer Repolarisation dar (18). Die Verflechtung des Wnt-Signalweges mit PPAR $\gamma$  konnte bereits bei der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten und Adipocyten, der proliferativen Aktivität von Gliomen und der invasiven Qualitäten in einem Prostatakrebsmodell gezeigt werden (52-55). Pukrop et al. haben gezeigt, dass der Wnt-Signalweg von entscheidender Bedeutung in TAMs ist (24, 56). Dies war einer der Gründe in dieser Arbeit den Einfluss des PPAR $\gamma$  Agonisten Pioglitazon im Hinblick auf die Aktivität des Wnt-Signalweges und die Expression des Wnt-targets E-Cadherin in MDMs zu untersuchen. Der Wnt-Signalweg wurde unter anderem wegen seiner Rolle bei Metastasierung, Tumorprogression und Inflammation ausgewählt (23, 24, 57, 58).

#### 4.3 Das „Wnt-target“ E-Cadherin spielt eine Rolle in Differenzierung myeloischer Zellen

E-Cadherin ist ein wichtiges Molekül bei der Differenzierung antigenpräsentierender Zellen, zu welchen Makrophagen gezählt werden können. Beispielsweise wird in Langerhanszellen durch TGF $\beta$  E-Cadherin hochreguliert, während TLR-Liganden, TNF und Interleukin-1  $\beta$  die Expression des Cdh1-Gens unterdrücken (59-61). Die Expression von E-Cadherin ist bei diesem Zelltyp essentiell für die Verankerung in der Epidermis und den Erhalt eines undifferenzierten Pools an Langerhanszellen, da die Bindung von E-Cadherin deren Reifung verhindert (62). Die inflammatorischen Stimuli dagegen induzieren Abbau von E-Cadherin, Reifung der Langerhanszellen und deren Abwanderung in die Lymphknoten.

Bei dendritischen Zellen führt die Unterbrechung von E-Cadherin-Bindungen oder Inhibition von GSK-3 $\beta$ , einer essentiellen, nachgeschalteten Komponente des Wnt-

Signalweges, zur partiellen Ausreifung zu Immuntoleranz induzierenden dendritischen Zellen.  $\beta$ -Catenin ist dabei ein wichtiger Baustein im Signalweg für diesen Effekt (63). Diese  $\beta$ -Catenin getriebene Differenzierung kann entsprechend durch TGF $\beta$  wieder unterbrochen werden (64).

Bei Makrophagen wird E-Cadherin unter Stimulation mit Interleukin 4, Interleukin 13 oder einer Kombination aus Interleukin-10 und TGF $\beta$  hochreguliert. Bisher wurden Polyamine und STAT-6 als verantwortliche Transkriptionsfaktoren für dessen Induktion identifiziert. E-Cadherin führt z.B. über Komplexbildung mit den entsprechenden Cateninen zur Makrophagenfusion und Bildung von Osteoclasten (65, 66). Wird dagegen LPS oder Interferon  $\gamma$  als Stimulans verwendet so wird E-Cadherin herunterreguliert. Die dafür verantwortlichen Transkriptionsfaktoren sind jedoch nicht abschließend identifiziert. In der Literatur werden STAT-1 und NF $\kappa$ B als Transkriptionsfaktoren für diese Rolle diskutiert (66-69).

Als zugrunde liegendes Muster zeichnet sich bei allen drei Zellreihen ab, dass eine klassische Aktivierung wie sie bei akuter Entzündung auftritt, zu einer Repression von E-Cadherin führt. Eine alternative Aktivierung induziert dagegen E-Cadherin. Wird die Expression von E-Cadherin durch Pioglitazon beeinflusst, so legt dies nahe, dass sich auch der Polarisationsphänotyp des Makrophagen ändert.

Aufgrund der bekannten Beeinflussung des Makrophagen, z.B. beim Aderhautmelanom durch PPAR $\gamma$  (70, 71) und vor dem Hintergrund, dass keiner der oben genannten Signalwege unilateral reguliert wird, war die Frage, ob PPAR $\gamma$  Wnt und PI3K beeinflusst und eine Repolarisation verursacht. Dazu wurde Pioglitazon als PPAR $\gamma$  Agonist ausgewählt. Die Substanz ist bereits als Medikament zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II zugelassen und hat damit ihre Bioverträglichkeit bereits unter Beweis gestellt. Pioglitazon wurde außerdem beim cholangiozellulären Karzinom, dem metastasierten malignen Melanom und dem Prostatakarzinom erfolgreich therapeutisch eingesetzt (35, 36, 51). Der Mechanismus der Wirkung ist bisher jedoch nicht genauer beleuchtet worden. Ziel dieser Arbeit war es zu erforschen ob Pioglitazon MDMs über eine vermehrte Expression von E-Cadherin zur Änderung ihres Polarisationsphänotyps bewegen kann. Ebenso sollte die Rolle der mit E-Cadherin verknüpften Signalwege, die eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum spielen, untersucht werden.

#### 4.4 Pioglitazon wirkt ab 5µM toxisch auf MDMs

In einem ersten Schritt wurde untersucht, in welchem Konzentrationsbereich Pioglitazon von Makrophagen vertragen wird. Dazu wurden MDMs mit steigenden Pioglitazonkonzentrationen behandelt und die Zellviabilität mittels MTT gemessen. Dabei konnte keine relevante Toxizität festgestellt werden. Der MTT misst indirekt die Aktivität mitochondrialer Reduktasen, und Pioglitazon nimmt als Antidiabetikum großen Einfluss auf den mitochondrialen Metabolismus (72, 73). Dies könnte die Ergebnisse maßgeblich beeinflusst haben. Deshalb wurden die Toxizitätsmessungen mittels BrdU-Assay wiederholt, um die MTT-Ergebnisse zu verifizieren. Der BrdU-Assay misst über den Einbau von Bromodesoxyuracil in DNA die Proliferationsaktivität von Zellen als Maß für deren Vitalität. Dabei zeigte sich ein deutlicher Einfluss von Pioglitazon auf die Proliferation bereits ab einer Konzentration von ca. 5µM. Hieraus kann geschlossen werden, dass der MTT nicht optimal zur Toxizitätsbestimmung von Pioglitazon bei Makrophagen geeignet ist. Deshalb wurden die Konzentrationsbereiche für die folgenden Experimente anhand der Daten aus dem BrdU-Assay gewählt. Weiter muss angemerkt werden, dass vor allem bei Makrophagen eine ausgeprägte DMSO-Toxizität zu verzeichnen war. In der Folge wurden entsprechende DMSO Kontrollansätze zur Kompensation für den DMSO-Effekt mitgeführt.

#### 4.5 Pioglitazon hat keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Zelllinien 4T1 und 410.4

Papi et al. haben gezeigt, dass Pioglitazon auch das Wachstum von Mammakarzinommikrosphären direkt inhibieren kann (74). Dies war der Grund dafür die murinen Mammakarzinomzelllinien 4T1 und 410.4 im gleichen Konzentrationsbereich wie die MDMs mit Pioglitazon zu stimulieren. Hierbei konnte jedoch kein Effekt auf Proliferation oder metabolische Aktivität festgestellt werden. Hierzu ist anzumerken, dass der untersuchte Konzentrationsbereich wesentlich geringer war als bei Papi et al. In der Literatur ist eine Serumkonzentration nach oraler Einnahme von Pioglitazon von ca. 1µM beschrieben (44). Die 10-20µM aus den Untersuchungen von Papi et al. entsprechen damit wahrscheinlich nicht den *in vivo* erreichbaren Konzentrationen. Damit ist vorerst bei den Zelllinien 4T1 und 410.4 als Modell für TN-Brustkrebs kein direkter tumorizider Mechanismus von Pioglitazon zu vermuten. Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass die in dieser Arbeit

gewonnenen Daten *in vitro* an Mauszelllinien gewonnen wurden und ein Rückschluss auf die Situation *in vivo* im Mausmodell wie beim Menschen nur sehr zurückhaltend gezogen werden darf.

#### 4.6 Pioglitazon führt nicht zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges in MDMs

Der Wnt-Signalweg spielt bei TAMs eine wichtige Rolle. Pukrop et al. konnten zeigen, dass Wnt aus Makrophagen die Invasion von Tumorzellen *in vitro* begünstigt. Die Daten hier zeigen, dass Pioglitazon, im Gegensatz zu LPS Wnt6 nicht induziert, sondern tendenziell eher reprimiert (Abbildung 3.21). Auch die beiden Inhibitoren des Wnt-Signalweges Axin2 und Dkk2 werden nach 24 Stunden nicht induziert. Axin2 wird sogar nach 72 Stunden unterdrückt (Abbildung 3.21). Zusammenfassend nimmt Pioglitazon weder aktivierenden noch reprimierenden Einfluss auf den Wnt-Signalweg.

#### 4.7 Pioglitazon hat keinen Effekt auf den PI3K Signalweg in MDMs

Zudem wurde der PI3K-Signalweg untersucht, da dieser ebenfalls von Wnt mit beeinflusst wird und im TAM eine entscheidende Rolle spielt (75). Dabei zeigte sich kein Einfluss einer Pioglitazonstimulation auf die Expression und Phosphorylierung von Akt und GSK3 $\beta$  in MDMs (Abbildung 3.16, Abbildung 3.17). Dies steht im Widerspruch zur Literatur. Dort wird eine hemmende Wirkung von PPAR $\gamma$  auf den PI3K/Akt Signalweg beschrieben (76). Dies könnte unterschiedlichen experimentellen Bedingungen geschuldet sein. Sowohl PPAR $\gamma$  als auch der PI3K-Signalweg werden aufgrund ihrer Beteiligung an grundlegenden Zellfunktionen, wie Proliferation und Energiehaushalt, durch andere Signalnetzwerke mit beeinflusst. Weitere Experimente müssen diese Verknüpfungen ausarbeiten, bevor eine abschließende Bewertung zum Einfluss von PPAR $\gamma$  auf den PI3K-Signalweg getroffen werden kann.

#### 4.8 Pioglitazon stimuliert die Expression von E-Cadherin in MDMs

Ein weiteres Protein, das mit Wnt und PI3K verknüpft ist, ist das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin. Seine Expression in Makrophagen wird üblicherweise mit einem antiinflammatorischen Phänotyp in Verbindung gebracht (45). Interessanterweise steigert Pioglitazon die Expression E-Cadherinexpression in MDMs nach Behandlung

mit Pioglitazon. Nach 72 Stunden war die Expression am Höchsten. Auf mRNA-Ebene bewirkt Pioglitazon zuerst eine Stabilisation der E-Cadherin Expression nach 24 Stunden. Nach 72 Stunden wird E-Cadherin auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass zu diesem Zeitpunkt Pioglitazon schon vollständig metabolisiert wurde und es schon wieder zu einer Gegenregulation als Folge einer Umpolarisierung der MDMs gekommen war. Dies wird durch die Ergebnisse der qRT-PCR auf CD 86 gestützt. Dessen Expressionssteigerung durch Pioglitazon scheint bereits nach 24 Stunden wieder abzuklingen. Eine Steigerung der E-Cadherinexpression legt die Vermutung nahe, dass  $\beta$ -Catenin als Bindungspartner und intrazelluläres Signalprotein mitreguliert wird. Die Western Blot-Analysen zeigten erwartungsgemäß eine Vermehrung des  $\beta$ -Catenin-Pools. Der vermehrte Nachweis von aktiviertem  $\beta$ -Catenin gelang jedoch nicht. Dies ist interessant, da E-Cadherin über  $\beta$ -Catenin Einfluss auf PI3K/Akt und den Wnt-Signalweg nehmen kann (45). Über PPAR $\gamma$  kann damit laut dieser Arbeit eine von Wnt und PI3K/Akt unabhängige Expression von E-Cadherin in MDM stimuliert werden.

Für die Funktionalität wirft dies einige Fragen auf. Die erhöhte Expression von E-Cadherin in Makrophagen deutet auf einen antiinflammatorischen Phänotyp hin (45). Eine erhöhte E-Cadherin Expression wird außerdem bei der Bildung von Granulomen beschrieben (77). Obwohl von einem antiinflammatorischen Phänotyp eine eher tumorprotektive Wirkung durch Erzeugung von Immuntoleranz zu erwarten ist (33, 45), könnte die Stabilisierung der Grenzfläche zwischen Tumor und umgebendem Stroma durch eine Art „epitheliale Barriere“ die Invasion von Tumorzellen in das umliegende Gewebe deutlich erschweren. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass durch Sekretion von Proteasen durch inflammatorische Makrophagen Metastasierung begünstigt wird (32). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass, obwohl Pioglitazon die Expression von Tnf $\alpha$  inhibiert, das proinflammatorische Interleukin 1 $\beta$  nicht supprimiert wird. Damit unterscheidet sich der Pioglitazon-induzierte Phänotyp vom klassisch antiinflammatorischen Phänotyp.

Wenn Pioglitazon zur vermehrten Expression von Zell-Zellkontaktmolekülen in Makrophagen führt, war zusätzlich die Frage, ob dies auch bei den Mammakarzinomzelllinien 4T1 und 410.4 der Fall ist. In den getesteten Konzentrationen war jedoch kein Effekt messbar. Dies unterstützt die Vermutung, dass

Pioglitazon in pharmakologisch erreichbaren Konzentrationen einen stärkeren Einfluss auf die Tumormikroumgebung, als auf die Tumorzelle direkt haben könnte.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Pioglitazon bei murinen Knochenmarksmakrophagen E-Cadherinexpression erhöht, ohne dabei den Wnt-Signalweg oder das PI3K/Akt-Netzwerk zu berühren. Der entstandene Phänotyp ist damit nicht direkt vergleichbar mit einem protumorigenen TAM. Außerdem ergaben sich Hinweise, dass Pioglitazon in pharmakologisch erreichbaren Konzentrationen keinen direkten Effekt auf Modellzellen eines TN-Brustkrebses hat. Damit ist ein therapeutischer Effekt am ehesten über eine Modulation der Tumormikroumgebung zu erwarten. Kritisch ist jedoch anzumerken, dass viele Ergebnisse nur knapp signifikant waren. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Metabolisierung von Pioglitazon in MDMs sehr schnell ist und die einmalige Stimulation am Beginn des Experiments nicht ausreichend war. Darauf deuten vor allem die Daten aus den qRT-PCR-Experimenten hin. Eventuell könnte man mit wiederholten Stimulationen die Unterschiede besser herausarbeiten.

Aus therapeutischer Sicht bedeutet dies, dass Pioglitazon als Monosubstanz wahrscheinlich keine vielversprechende Therapie darstellt. Die zusätzliche Verwendung innerhalb eines metronomen Therapieschemas mit kontinuierlicher Gabe könnte jedoch die Therapie entscheidend verbessern, z.B. indem Metastasierung wirksam behindert wird. Gleichzeitig sind die hier gezeigten Ergebnisse *in vitro* gewonnen worden. Die Machbarkeit und Wirksamkeit einer solchen Therapie müssen in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Behandlung metastasierter Brustkrebserkrankungen stellt bis heute eine große therapeutische Herausforderung dar und die Überlebenszeiten sind, insbesondere beim triple negativen Brustkrebs, weiterhin kurz. Zur Erkrankung zählt aber nicht nur der Tumor selbst, sondern auch ein Netzwerk an Stromazellen und extrazellulärer Matrix. So genannte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) nehmen dabei wesentlichen Einfluss auf die Kontrolle und Metastasierung der Erkrankung. TAMs zeigen in der Regel einen immunsupprimierenden und protumorigenen Phänotyp. Über die Sekretion von Proteasen schwächen sie die Barriere der Basalmembran und begünstigen Metastasierung von Tumorzellen. Außerdem können sie durch die Sekretion von Wnt die Invasivität der Tumorzellen verbessern. Daneben zeichnen sie sich aber auch durch eine hohe morphologische und metabolische Plastizität aus, was sie zu einem interessanten therapeutischen Ziel macht. PPAR $\gamma$  wird in Makrophagen exprimiert und es existiert mit dem Thiazolidindienon Pioglitazon ein PPAR $\gamma$ -Agonist, der bereits als Medikament zugelassen ist. Pioglitazon wurde schon bei einigen Krebserkrankungen wie dem Prostatakarzinom, dem Aderhautmelanom und der Chronisch myeloischen Leukämie erfolgreich eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Pioglitazon auf den Phänotyp muriner Knochenmarksmakrophagen (MDM) als Modell für TAM untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon eine Wnt und PI3K unabhängige Steigerung der E-Cadherin-Expression induziert. Inflammatorische Proteine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden durch Pioglitazon tendenziell unterdrückt. Die Expression von E-Cadherin ist bei Makrophagen ein Merkmal antiinflammatorischer, alternativ aktivierter Makrophagen. Diese werden in der Literatur mit der Förderung von Tumorwachstum in Verbindung gebracht. Auf der anderen Seite ist E-Cadherin Voraussetzung für die Induktion von Granulomen und den Aufbau einer pseudoepithelialen Barriere, die eine Tumorprogression verhindern kann. Der Phänotyp eines Pioglitazon stimulierten MDM liegt dabei näher am antiinflammatorischen Typus als am inflammatorischen Typus. Der positive, therapeutische Nutzen könnte damit im Aufbau einer pseudoepithelialen Barriere in Verbindung mit einer verbliebenen tumoriziden Entzündungsaktivität liegen. Hier sind weiterführende Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* notwendig um diese Fragen zu klären.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Institut GdeKiDR-K. Krebs in Deutschland für 2013 / 20142017.
2. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietersen JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer*. 2015;121(1):8-16.
3. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer*. 2007;109(9):1721-8.
4. André F, Zielinski CC. Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Annals of Oncology*. 2012;23(suppl\_6):vi46-vi51.
5. Munzone E, Colleoni M. Clinical overview of metronomic chemotherapy in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(11):631-44.
6. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res*. 2000;60(7):1878-86.
7. Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*. 2000;105(8):R15-24.
8. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(5):641-8.
9. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol*. 2009;183(1):137-44.
10. Banys-Paluchowski M, Schutz F, Ruckhaberle E, Krawczyk N, Fehm T. Metronomic Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer - a Systematic Review of the Literature. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2016;76(5):525-34.
11. Hart C, Vogelhuber M, Wolff D, Klobuch S, Ghibelli L, Foell J, et al. Anakinosis: Communicative Reprogramming of Tumor Systems - for Rescuing from

Chemorefractory Neoplasia. *Cancer microenvironment* : official journal of the International Cancer Microenvironment Society. 2015;8(2):75-92.

12. Armstrong H, Bording-Jorgensen M, Dijk S, Wine E. The Complex Interplay between Chronic Inflammation, the Microbiome, and Cancer: Understanding Disease Progression and What We Can Do to Prevent It. *Cancers*. 2018;10(3):83.

13. Vamecq J, Colet JM, Vanden Eynde JJ, Briand G, Porchet N, Rocchi S. PPARs: Interference with Warburg' Effect and Clinical Anticancer Trials. *PPAR Res*. 2012;2012:304760.

14. Chou F-S, Wang P-S, Kulp S, Pinzone JJ. Effects of Thiazolidinediones on Differentiation, Proliferation, and Apoptosis. *Molecular Cancer Research*. 2007;5(6):523-30.

15. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*. 2000;49(10):497-505.

16. Gurnell M. 'Striking the Right Balance' in Targeting PPARgamma in the Metabolic Syndrome: Novel Insights from Human Genetic Studies. *PPAR Res*. 2007;2007:83593.

17. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1997;99(10):2416-22.

18. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, et al. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2920-5.

19. Rizos CV, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Pleiotropic effects of thiazolidinediones. *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9(7):1087-108.

20. Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, et al. Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(14):5454-9.

21. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010;12(5):468-76.

22. Liu H, Nakazawa T, Tezuka T, Yamamoto T. Physical and functional interaction of Fyn tyrosine kinase with a brain-enriched Rho GTPase-activating protein TCGAP. *J Biol Chem.* 2006;281(33):23611-9.
23. Raupach T, Hanneforth N, Anders S, Pukrop T, Th JtCO, Harendza S. Impact of teaching and assessment format on electrocardiogram interpretation skills. *Med Educ.* 2010;44(7):731-40.
24. Petereit HF, Reske D, Pukrop R, Maas-Enriquez M, Japp G, Jongen PJ, et al. No effect of intravenous immunoglobulins on cytokine-producing lymphocytes in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2006;12(1):66-71.
25. Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, et al. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;368(9541):1096-105.
26. Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y, Ueda Y, Koide H. Effect of pioglitazone on urinary liver-type fatty acid-binding protein concentrations in diabetes patients with microalbuminuria. *Diabetes/metabolism research and reviews.* 2006;22(5):385-9.
27. Khanolkar MP, Morris RHK, Thomas AW, Bolusani H, Roberts AW, Geen J, et al. Rosiglitazone produces a greater reduction in circulating platelet activity compared with gliclazide in patients with type 2 diabetes mellitus; An effect probably mediated by direct platelet PPAR $\beta$  activation. *Atherosclerosis.* 197(2):718-24.
28. Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC. The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003;42(10):1757-63.
29. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer.* 1999;79(5-6):991-5.
30. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep.* 2005;14(2):425-31.
31. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006;66(2):605-12.

32. Ojalvo LS, Whittaker CA, Condeelis JS, Pollard JW. Gene expression analysis of macrophages that facilitate tumor invasion supports a role for Wnt-signaling in mediating their activity in primary mammary tumors. *J Immunol.* 2010;184(2):702-12.
33. Cassetta L, Pollard JW. Repolarizing macrophages improves breast cancer therapy. *Cell Research.* 2017;27:963.
34. Kitamura T, Doughty-Shenton D, Cassetta L, Fragkogianni S, Brownlie D, Kato Y, et al. Monocytes Differentiate to Immune Suppressive Precursors of Metastasis-Associated Macrophages in Mouse Models of Metastatic Breast Cancer. *Frontiers in Immunology.* 2018;8(2004).
35. Walter B, Schrettenbrunner I, Vogelhuber M, Grassinger J, Bross K, Wilke J, et al. Pioglitazone, etoricoxib, interferon-alpha, and metronomic capecitabine for metastatic renal cell carcinoma: final results of a prospective phase II trial. *Med Oncol.* 2012;29(2):799-805.
36. Reichle A, Vogt T, Coras B, Terheyden P, Neuber K, Trefzer U, et al. Targeted combined anti-inflammatory and angiostatic therapy in advanced melanoma: a randomized phase II trial. *Melanoma Res.* 2007;17(6):360-4.
37. Hau P, Kunz-Schughart L, Bogdahn U, Baumgart U, Hirschmann B, Weimann E, et al. Low-dose chemotherapy in combination with COX-2 inhibitors and PPAR-gamma agonists in recurrent high-grade gliomas - a phase II study. *Oncology.* 2007;73(1-2):21-5.
38. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology.* 2008;8:958.
39. Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligiel Z, Vogel R, Heppner GH. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1978;38(10):3174-81.
40. Heppner GH, Dexter DL, DeNucci T, Miller FR, Calabresi P. Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. *Cancer Res.* 1978;38(11 Pt 1):3758-63.
41. Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2(5):331-4.
42. Fernandez-Boyanapalli RF, Frasci SC, Thomas SM, Malcolm KC, Nicks M, Harbeck RJ, et al. Pioglitazone restores phagocyte mitochondrial oxidants and bactericidal capacity in chronic granulomatous disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2015;135(2):517-27.e12.

43. Xie X, Sinha S, Yi Z, Langlais PR, Madan M, Bowen BP, et al. Role of adipocyte mitochondria in inflammation, lipemia and insulin sensitivity in humans: effects of pioglitazone treatment. *Int J Obes (Lond)*. 2017.
44. Wittayalertpanya S, Chompootawee S, Thaworn N. The pharmacokinetics of pioglitazone in Thai healthy subjects. *J Med Assoc Thai*. 2006;89(12):2116-22.
45. Van den Bossche J, Malissen B, Mantovani A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs. *Blood*. 2012;119(7):1623-33.
46. Murray Peter J, Allen Judith E, Biswas Subhra K, Fisher Edward A, Gilroy Derek W, Goerdts S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
47. Wong SHM, Fang CM, Chuah L-H, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2018;121:11-22.
48. Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):101.
49. Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(10):2857-65.
50. Philippe R, Stéphane P, Joelle G, Lydia R, Gabriel E, Laurence L, et al. Pioglitazone together with imatinib in chronic myeloid leukemia: A proof of concept study. *Cancer*. 2017;123(10):1791-9.
51. Walter I, Schulz U, Vogelhuber M, Wiedmann K, Endlicher E, Klebl F, et al. Communicative reprogramming non-curative hepatocellular carcinoma with low-dose metronomic chemotherapy, COX-2 inhibitor and PPAR-gamma agonist: a phase II trial. *Med Oncol*. 2017;34(12):192.
52. Annicotte JS, Iankova I, Miard S, Fritz V, Sarruf D, Abella A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates E-cadherin expression and inhibits growth and invasion of prostate cancer. *Mol Cell Biol*. 2006;26(20):7561-74.
53. Vella V, Nicolosi ML, Giuliano S, Bellomo M, Belfiore A, Malaguarnera R. PPAR- $\gamma$  Agonists As Antineoplastic Agents in Cancers with Dysregulated IGF Axis. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;8:31.

54. Vallée A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallée J-N. Opposite Interplay Between the Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway and PPAR Gamma: A Potential Therapeutic Target in Gliomas. *Neuroscience bulletin*. 2018;34(3):573-88.
55. Yue L, Daxiang J, Weixing X, Longfei W, Weijian C, Jixi X, et al. PPAR- $\gamma$  and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2018;13(3):185-92.
56. Menck K, Klemm F, Gross JC, Pukrop T, Wenzel D, Binder C. Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles. *Oncotarget*. 2013;4(11):2057-66.
57. Laprise P, Langlois MJ, Boucher MJ, Jobin C, Rivard N. Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2004;199(1):32-9.
58. De Santis G, Miotti S, Mazzi M, Canevari S, Tomassetti A. E-cadherin directly contributes to PI3K/AKT activation by engaging the PI3K-p85 regulatory subunit to adherens junctions of ovarian carcinoma cells. *Oncogene*. 2009;28(9):1206-17.
59. Kel JM, Girard-Madoux MJ, Reizis B, Clausen BE. TGF-beta is required to maintain the pool of immature Langerhans cells in the epidermis. *J Immunol*. 2010;185(6):3248-55.
60. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, Romani N, et al. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*. 2005;22(5):643-54.
61. Villablanca EJ, Mora JR. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur J Immunol*. 2008;38(11):2975-80.
62. Polgar C, Sulyok Z, Major T, Riedl E, Somogyi A, Fodor J, et al. [Reexcision and perioperative brachytherapy in the treatment of local relapse after breast conservation: a possible alternative to mastectomy]. *Magy Seb*. 2000;53(3):120-3.
63. Jiang A, Bloom O, Ono S, Cui W, Unternaehrer J, Jiang S, et al. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity*. 2007;27(4):610-24.
64. Vander Lugt B, Beck ZT, Fuhlbrigge RC, Hacohen N, Campbell JJ, Boes M. TGF-beta suppresses beta-catenin-dependent tolerogenic activation program in dendritic cells. *PLoS One*. 2011;6(5):e20099.

65. Moreno JL, Mikhailenko I, Tondravi MM, Keegan AD. IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin. *J Leukoc Biol.* 2007;82(6):1542-53.
66. Van den Bossche J, Bogaert P, van Hengel J, Guérin CJ, Berx G, Movahedi K, et al. Alternatively activated macrophages engage in homotypic and heterotypic interactions through IL-4 and polyamine-induced E-cadherin/catenin complexes. *Blood.* 2009;114(21):4664-74.
67. Kranzer K, Sollner L, Aigner M, Lehn N, Deml L, Rehli M, et al. Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells. *Infect Immun.* 2005;73(7):4180-9.
68. Devoogdt N, Revets H, Kindt A, Liu YQ, De Baetselier P, Ghassabeh GH. The tumor-promoting effect of TNF- $\alpha$  involves the induction of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol.* 2006;177(11):8046-52.
69. Helming L, Tomasello E, Kyriakides TR, Martinez FO, Takai T, Gordon S, et al. Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state. *Sci Signal.* 2008;1(43):ra11.
70. Cheng WY, Huynh H, Chen P, Pena-Llopis S, Wan Y. Macrophage PPAR $\gamma$  inhibits Gpr132 to mediate the anti-tumor effects of rosiglitazone. *Elife.* 2016;5.
71. Herwig MC, Bergstrom C, Wells JR, Holler T, Grossniklaus HE. M2/M1 ratio of tumor associated macrophages and PPAR- $\gamma$  expression in uveal melanomas with class 1 and class 2 molecular profiles. *Exp Eye Res.* 2013;107:52-8.
72. Kalavalapalli S, Bril F, Koelmel JP, Abdo K, Guingab J, Andrews P, et al. Pioglitazone improves hepatic mitochondrial function in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 0(0):null.
73. Araki E, Nishikawa T. Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *Journal of diabetes investigation.* 2010;1(3):90-6.
74. Papi A, De Carolis S, Bertoni S, Storci G, Sceberras V, Santini D, et al. PPAR $\gamma$  and RXR ligands disrupt the inflammatory cross-talk in the hypoxic breast cancer stem cells niche. *J Cell Physiol.* 2014;229(11):1595-606.

75. Kaneda MM, Cappello P, Nguyen AV, Ralainirina N, Hardamon CR, Foubert P, et al. Macrophage PI3Kgamma Drives Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression. *Cancer Discov.* 2016;6(8):870-85.
76. Vallee A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallee JN. Opposite Interplay Between the Canonical WNT/beta-Catenin Pathway and PPAR Gamma: A Potential Therapeutic Target in Gliomas. *Neuroscience bulletin.* 2018.
77. Cronan MR, Beerman RW, Rosenberg AF, Saelens JW, Johnson MG, Oehlers SH, et al. Macrophage Epithelial Reprogramming Underlies Mycobacterial Granuloma Formation and Promotes Infection. *Immunity.* 2016;45(4):861-76.



# Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Tobias Pukrop bedanken, der es geschafft hat nach einer wissenschaftlichen Durststrecke meine Begeisterung für die Naturwissenschaft durch seine Leidenschaft für die Forschung wieder zu wecken. Er hat mich während der Erstellung dieser Arbeit mit seinem präzisen wissenschaftlichen Verstand und seinem enzyklopädischen Wissen immer unterstützt und motiviert. Ebenso danke ich für die Erstellung des Erstgutachtens.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Raquel Blazquez für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen bei der Interpretation der Ergebnisse und die methodische Anleitung im Labor bedanken. Ohne sie wären die qRT-PCR Experimente nicht möglich gewesen. Außerdem danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Weiter gilt mein Dank Frau PD Dr. Anja-Kathrin Wege für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pukrop, Daniela, Elena und Laura, bedanke ich mich für die technische Unterstützung, und die entspannten und freundlichen Arbeitsbedingungen während meiner Tätigkeit im Labor. Insbesondere sei hier noch einmal Elena Vollmer explizit erwähnt, deren Bereitschaft mir mit ihrer technischen Expertise bei Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzen zu helfen unbezahlbar ist.

An dieser Stelle sei auch Frau Dr. Sabine Iberl erwähnt, die sich in liebevoller Kleinarbeit der Durchsicht dieses Manuskripts gewidmet hat und viele gute Verbesserungsvorschläge eingebracht hat.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an meine Frau Irmgard und meine Familie, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit neben einer klinischen Tätigkeit in Vollzeit und der Geburt zweier Kinder abzuschließen. Vielen Dank, dass ihr mir den Rücken freigehalten habt.